

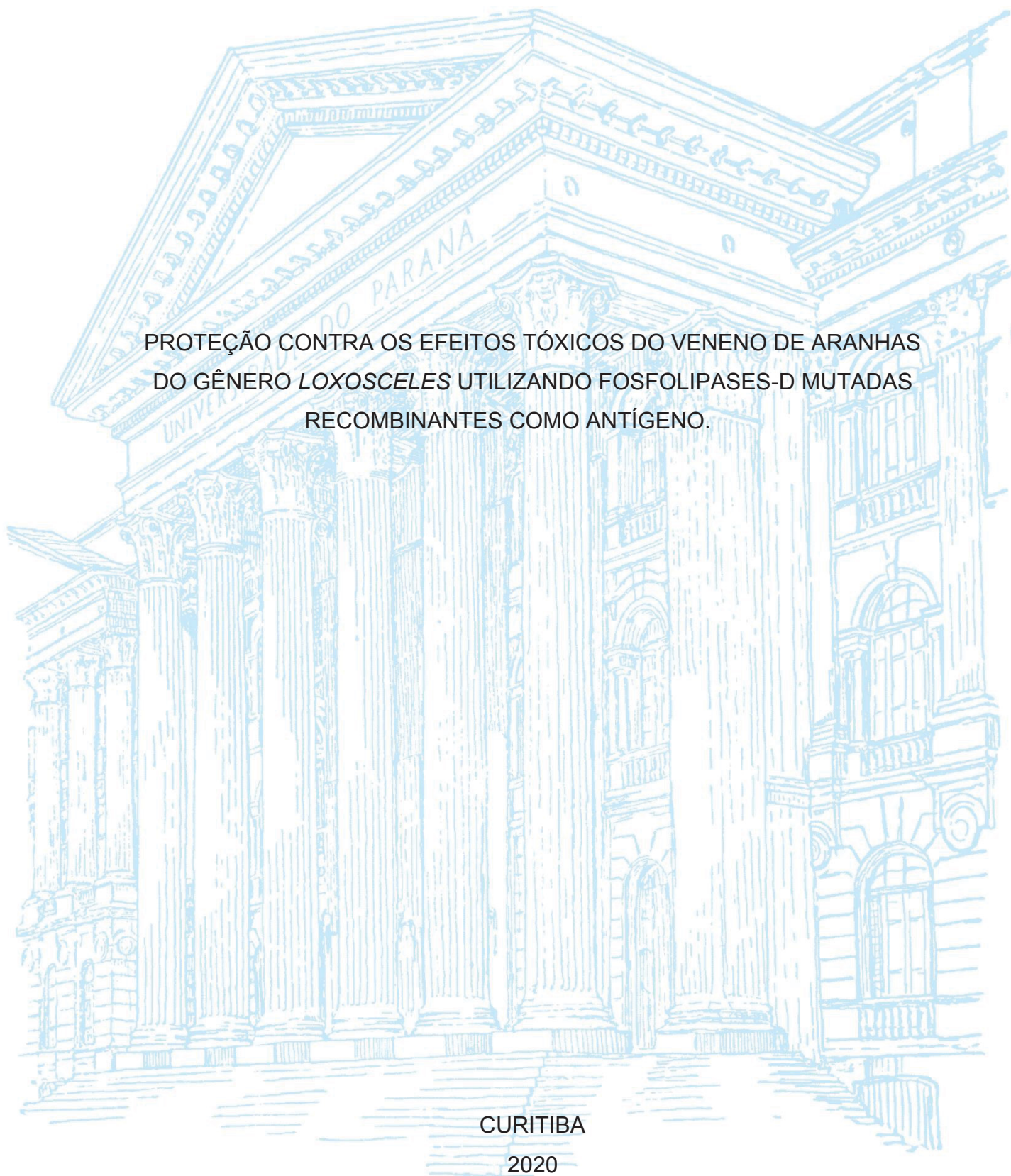
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYANNE LOUISE COSTACURTA POLLI

PROTEÇÃO CONTRA OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DE ARANHAS
DO GÊNERO *LOXOSCELES* UTILIZANDO FOSFOLIPASES-D MUTADAS
RECOMBINANTES COMO ANTÍGENO.

CURITIBA

2020



NAYANNE LOUISE COSTACURTA POLLI

PROTEÇÃO CONTRA OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DE ARANHAS
DO GÊNERO *LOXOSCELES* UTILIZANDO FOSFOLIPASES-D MUTADAS
RECOMBINANTES COMO ANTÍGENO.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Luiza Helena Gremski

Coorientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Polli, Nyanne Louise Costacurta.

Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranha do gênero
Loxosceles utilizando fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígeno.
/ Nyanne Louise Costacurta Polli. – Curitiba, 2020.
125 f. : il.

Orientadora: Luiza Helena Gremski.

Coorientador: Silvio Sanches Veiga.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Loxosceles. 2. Aranha-marrom. 3. Fosfolipases. 4. Vacinas. I. Título. II.
Gremski, Luiza Helena. III. Veiga, Silvio Sanches. IV. Universidade Federal
do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 595.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NAYANNE LOUISE COSTACURTA POLLI** intitulada: **Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranha do gênero *Loxosceles* utilizando fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígeno.**, sob orientação da Profa. Dra. LUIZA HELENA GREMSKI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 16:43:00.0

LUIZA HELENA GREMSKI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 18:43:40.0

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/04/2020 15:34:55.0

ANDREA NOVAIS MORENO AMARAL

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

ATA Nº467

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

No dia dois de abril de dois mil e vinte às 13:30 horas, na sala online, Plataforma online Google Hangouts, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **NAYANNE LOUISE COSTACURTA POLLI**, intitulada: **Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranha do gênero *Loxosceles* utilizando fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígeno.**, sob orientação da Profa. Dra. LUIZA HELENA GREMSKI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, foi constituída pelos seguintes Membros: LUIZA HELENA GREMSKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JULIANA FERREIRA DE MOURA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ANDREA NOVAIS MORENO AMARAL (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUIZA HELENA GREMSKI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 02 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 16:43:00.0

LUIZA HELENA GREMSKI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 18:43:40.0

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/04/2020 15:34:55.0

ANDREA NOVAIS MORENO AMARAL

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Esse sonho começou há tanto tempo que não me lembro da última vez que não sonhei com isso. Inspirada por todos os educadores formais que passaram na minha vida, hoje tenho o sonho de também poder ensinar. Ademais, devido a toda a minha curiosidade inata a ciência e pesquisa surgiram em minha vida como uma tentativa de sanar alguns dos meus porquês. Hoje sei que quanto mais se pesquisa mais porquês temos e isso sempre será a alavanca que impulsiona a vontade de nunca parar. Desejo que nunca nada nem ninguém roube minha curiosidade.

Hoje, foi me dada a oportunidade de agradecer a todos que me inspiraram na construção dos meus sonhos e aos que estão ajudando a torná-los realidade, as vezes sem nem saber. Dedico este trabalho a todos vocês.

A toda minha família, vocês me deram a vida e constantemente me ensinam o verdadeiro significado dela. Sem vocês nada disso seria possível. Meu muito obrigada por apoiarem minhas escolhas e decisões como se fossem as suas. É muito bom viver tendo a certeza que se tudo der errado eu ainda posso contar com vocês. Em especial aos meus pais, que sempre investiram todo o tempo e dinheiro na minha educação formal e não formal. A minha eterna gratidão, minha maior alegria hoje é saber o quanto vocês estão orgulhosos com essa conquista. Ela também é de vocês!

A todas as mulheres que me inspiram a ser forte e independente. Em especial a minha mãe e avós que mesmo sob todas as adversidades demonstraram serem leas, capazes de dar tudo de si para proteger seus filhotes. Vocês são meus maiores exemplos de dedicação e perseverança. Sorte a minha se eu puder ter pelo menos a metade dessa garra.

Ao meu namorado, eterno melhor amigo e confidente, talvez a pessoa que mais acredita que sou capaz, as vezes mais do que eu mesma. Você é minha força para continuar perseguindo meus sonhos. Obrigada por ouvir todas as minhas reclamações com o maior carinho do mundo mesmo sem nem ao menos saber o que é um ELISA, um Westen Blot ou até uma micropipeta.

A todos os meus amigos e amigas, escolhi vocês para estarem na minha vida por me inspirarem, me fazerem rir e porque tenho certeza de que posso contar com vocês para tudo. Obrigada por tornarem todo o processo bem mais leve (e com muita festa). Minhas melhores amigas, Gi, Mari e Gabi “minhas pessoas” vocês são parte fundamental de quem eu sou, faria de tudo para ver vocês felizes e toda vez que vocês

são felizes eu sou em dobro.

Ao meu time LME, companheiros de laboratório e hoje mais do que isso, meus amigos. Tudo que eu sei eu devo a vocês, todos os experimentos que estão aqui são 100% reflexo da ajuda que eu sempre recebi de todos. Nunca vou esquecer do quanto vocês foram importantes para que isso fosse possível, gostaria de dividir essa conquista com todos. Minha amiga Hanna, muito obrigada por todas as vezes que me salvou com meus camundongos, trocando caixas, tentando me ensinar a contenção e me vendo levar INÚMERAS mordidas nos dedos, não desista de mim, um dia eu chego lá. Meu amigo Bruno, obrigada pelas inúmeras ajudas, conselhos sobre experimentos e por sempre estar disposto a compartilhar todo seu conhecimento comigo.

A toda a equipe do CCPI (Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos) que me acolheu desde o estágio obrigatório e fez eu me sentir em casa todo o tempo. Em especial ao Paulinho que sempre com muita boa vontade me ajudou muito durante o período de mestrado. Também gostaria de agradecer o meu primeiro orientador e a pessoa que me inspirou a seguir o ramo da pesquisa Prof. Dr. João Carlos Minozzo. Professor, muito obrigada por toda a orientação, ajuda, conversas e sobretudo pela amizade. Quando eu crescer quero ser igual ao senhor: Ter muita disposição para trabalhar, ser humilde, generosa, otimista e uma exímia professora e pesquisadora.

A minha orientadora Profa. Dra. Luiza Helena Gremski por ter toda a paciência do mundo comigo, por sempre ser muito atenciosa, por todos os puxões de orelha merecidos, por todas as correções sempre muito bem feitas e todas as ajudas em experimentos. Ter uma orientadora que não só orienta, mas também coloca a mão na massa fez toda a diferença. Também ao meu co-orientador Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pelas inúmeras ajudas em experimentos, conselhos e suporte financeiro. Professores Luiza e Silvio, minha eterna gratidão e admiração, sem toda a ajuda e suporte oferecidos eu não teria conseguido. Vocês são meus maiores exemplos de dedicação e amor pela ciência, obrigada por todos os desafios e por me fazerem aprender todos os dias. Por último e não menos importante, obrigada Universidade Federal do Paraná, minha segunda casa, por toda a estrutura oferecida. Lutarei em sua defesa.

À CAPES, Fundação Araucária, CNPq e familiares pelo apoio financeiro.

“Pode haver momentos mais bonitos,
mas este é nosso”
Jean-Paul Sartre

RESUMO

O envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*, popularmente conhecidas como aranhas marrons, é um problema de saúde pública em muitas regiões do Brasil, onde foram notificados 7.992 casos e 9 óbitos no ano de 2017. As espécies mais comumente envolvidas em acidentes no Brasil são *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. O loxoscelismo é uma síndrome necrótica-hemolítica causada pela picada de aranha marrom, que, em casos raros, pode levar ao óbito. O veneno de *Loxosceles* é formado por uma mistura complexa de toxinas, e é rico em proteínas, enzimas e peptídeos. Entre essas enzimas destacam-se as fosfolipases-D (FLD), ou toxinas dermonecroticas; sozinhas elas podem reproduzir experimentalmente a maioria dos sintomas do loxoscelismo. Apesar de os acidentes com aranhas marrons serem um problema de saúde pública, uma terapia definitiva ainda não foi estabelecida. A soroterapia heteróloga ainda é o método que apresenta o maior potencial terapêutico, porém, por diversos fatores, ainda é uma terapia muito limitada, não é isenta de riscos, é de difícil obtenção e causa sofrimento ao animal produtor do soro. Tendo em vista a necessidade de se pensar em métodos alternativos aos já existentes uma estratégia preventiva poderia ser aplicada em regiões onde o loxoscelismo é endêmico, em pessoas que já utilizaram qualquer soro heterólogo de origem equina ou em pacientes não elegíveis para a soroterapia. Portanto, este projeto teve como objetivo o uso de FLDs mutadas recombinantes como imunógenos de um composto vacinal capaz de proteger coelhos e camundongos frente ao veneno das espécies de *Loxosceles*. As proteínas mutadas recombinantes escolhidas como antígenos para a formulação vacinal (Y228A *L. intermedia*, E32A/D34A *L. gaucho* e H12A/H47A *L. laeta*) apresentaram alto potencial imunogênico, perda da atividade esfingomielinásica e da capacidade de desenvolver dermonecrose. Na sequência, foram realizados testes para avaliar o efeito protetivo promovido por esses antígenos frente ao veneno loxoscélico. Coelhos vacinados com diferentes formulações vacinais foram desafiados com os venenos loxoscélicos em ensaios de dermonecrose e avaliações hematológicas e bioquímicas foram realizadas. Foram observadas reduções expressivas em eritema, equimose e dermonecrose nos animais vacinados em relação aos animais não vacinados (controles negativo). A vacinação foi capaz de causar reduções de até 95% em edema. Parâmetros hematológicos indicaram uma grande produção de linfócitos nos animais vacinados após o desafio com os venenos loxoscélicos, indicando uma resposta imunológica. Ainda, parâmetros bioquímicos não indicaram sinais contundentes de danos renais e hepáticos causados pelos venenos, nem nos animais controle negativo. O efeito protetivo da vacinação frente aos danos sistêmicos do envenenamento foi mais bem avaliado em camundongos. A vacinação nesses animais promoveu 79% de proteção frente à letalidade causada pelo veneno de *L. intermedia* em 72 horas. No mesmo tempo, camundongos controle negativo apresentaram 100% de letalidade. Os resultados obtidos no presente estudo comprovam a eficácia e segurança no uso de FLDs mutadas recombinantes como antígenos. Isso ressalta o potencial dessas moléculas como bioferramentas para o desenvolvimento de novos tratamentos para o loxoscelismo, como vacinação ou soroterapia de segunda geração.

Palavras-chave: *Loxosceles*. Fosfolipase-D. Vacina.

ABSTRACT

Envenomation by *Loxosceles* spiders, popularly known as brown spiders, is a public health problem in many regions of Brazil, where 7,992 cases and 9 deaths were reported in 2017. The species most commonly involved in accidents in Brazil are *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*. Loxoscelism is a necrotic-hemolytic syndrome triggered by the brown spider bite, which, in rare cases, can lead to death. *Loxosceles*' venom consists of a complex mixture of toxins enriched in proteins, enzymes and peptides. However, phospholipases-D (PLD), or dermonecrotic toxins, can be considered the most important toxin of this venom, since they can reproduce experimentally the majority of symptoms of loxoscelism. A definitive therapy is not yet established. Serum therapy is the method that has the greatest therapeutic potential; however, it is still very limited. It is not risk-free, difficult to obtain and causes animal suffering during the production. In attempt to establish new methods, a preventive strategy could be applied in areas where loxoscelism is endemic, in people who had already used any heterologous serum of equine origin, as well as in people not eligible to use serum therapy. In this context, this work proposes the use of recombinant mutated PLDs as antigens in a vaccine capable to protect rabbits and mice from the action of *Loxosceles* venom. The recombinant mutated PLDs chosen as antigens (LiRec Y228A, LgRec E32A/D34A and LIRec H12A/H47A) showed a high immunogenic potential, lost their capacity to hydrolyze sphingomyelin and to develop dermonecrosis. Then these proteins were used to evaluate if they were able to elicit some protective response against *Loxosceles* venom. For this, rabbits were administered with different vaccine formulations and then challenged with whole venom. Hematological and biochemical parameters were also evaluated. Reductions of up to 95% in edema and a significant decrease in erythema, bruise and dermonecrosis were observed in vaccinated animals when compared to negative control animals. Hematological findings showed a large production of lymphocytes in vaccinated animals after the challenge with *Loxosceles* venom, suggesting a stimulation of immune system. In addition, biochemical parameters did not indicate strong signs of kidney and liver damage caused by envenomation, even in negative control animals. The systemic damage induced by the venom was better evaluated in mice. Vaccination in these animals provided 79% of protection against the lethality caused by the *L. intermedia* venom in 72 hours. At the same time, negative control mice showed 100% lethality. Results showed in the present study evidence the efficacy and safety of using recombinant mutated PLDs as antigens. This highlights the potential of these molecules as bio tools for development of new treatments for loxoscelism, such as vaccines or second-generation serum therapy.

Keywords: *Loxosceles*. Phospholipase-D. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ARANHAS MARROM ADULTAS. A) <i>LOXOSCELES GAUCHO</i> , B) <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E C) <i>LOXOSCELES LAETA</i>	19
FIGURA 2 - ACIDENTES ENVOLVENDO ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> SP. NO BRASIL NO ANO DE 2017	21
FIGURA 3 - PROGRESSÃO DO LOXOSCELISMO CUTÂNEO. A- 1 DIA; B- 9 DIAS; C- 16 DIAS D- 25 DIAS.....	22
FIGURA 4 - PROPORÇÃO RELATIVA DE CADA GRUPO DE TOXINAS SOBRE O TOTAL DE TRANSCRITOS DE TOXINAS.	25
FIGURA 5 – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES D COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS.	44
FIGURA 6 – ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA (<i>AMPLEX RED</i>) DAS FOSFOLIPASES D SELVAGENS E COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS.....	45
FIGURA 7 – ATIVIDADE DERMONECRÓTICA DAS FOSFOLIPASES D COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS.	45
FIGURA 8– REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA (<i>WESTERN BLOT</i>) DE FOSFOLIPASES D RECOMBINANTES SELVAGENS E SUAS ISOFORMAS MUTADAS.	46
FIGURA 9 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES DERMONECRÓTICAS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i> (A), <i>L. LAETA</i> (B) E <i>L. GAUCHO</i> (C) NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS (GRUPO 1 E 2).	48
FIGURA 10– AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES DERMONECRÓTICAS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i> (A), <i>L. LAETA</i> (B) E <i>L. GAUCHO</i> (C) NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.....	52
FIGURA 11 – AVALIAÇÃO CINÉTICA DO EDEMA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i> (A) <i>L. LAETA</i> (B) E <i>L. GAUCHO</i> (C) NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.....	55
FIGURA 12 – REATIVIDADE IMUNOLÓGICA (<i>WESTERN BLOT</i>) DE ANIMAIS VACINADOS COM AS FORMULAÇÕES 1, 2 E 3.	64

FIGURA 13 - REATIVIDADE IMUNOLÓGICA (<i>ELISA</i>) DE ANIMAIS VACINADOS COM AS FORMULAÇÕES 1, 2 E 3.....	65
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FOSFOLIPASES-D LOXOSCÉLICAS RECOMBINANTES E SUAS ATIVIDADES.....	28
TABELA 2 - VALORES MÉDIOS DE EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E IMUNIZADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i>	56
TABELA 3 - VALORES MÉDIOS DE EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E IMUNIZADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. LAETA</i>	57
TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DE EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E IMUNIZADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. GAUCHO</i>	57
TABELA 5- VALORES DE REFERÊNCIA DE ERITOGrama, LEUCOGrama E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA COELHOS.....	58
TABELA 6- CONTAGEM DE ERITOGrama E LEUCOGrama ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO DO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i> EM ANIMAIS VACINADOS E CONTROLE NEGATIVO	59
TABELA 7– AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i> NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.	60
TABELA 8- AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. LAETA</i> NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.....	61
TABELA 9- AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. LAETA</i> NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.....	62
TABELA 10– AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE <i>L. GAUCHO</i> NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.....	63

TABELA 11– EFEITO PROTETIVO DA VACINAÇÃO FRENTE À LETALIDADE EM CAMUNDONGOS CAUSADA PELO VENENO DE <i>LOXOSCELES</i> <i>INTERMEDIA</i>	66
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	- Alanina Aminotransferase
AST	- Aspartato Aminotransferase
CK-M	- Creatinoquinase Muscular
FLD	- Fosfolipase-D
GGT	- Gamaglutamiltransferase
IRA	- Insuficiência Renal Aguda
LDH	- Lactato Desidrogenase
LiRecDT	- <i>Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin</i>
Loxtox	- <i>Loxosceles toxin</i>
LPC	- Lisofosfatidilcolina
MEC	- Matriz extracelular
MMPs	- Metaloproteinases de matriz
Sictox	- <i>Sicariidae toxin</i>
SINAN-MS	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde
SM	- Esfingomielina
Smase D	- Esfingomielinase D
SUS	- Sistema Único de Saúde
TCTP	- <i>Translationally Controlled Tumor Protein</i>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>LOXOSCELES</i> SP.	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.3 LOXOSCELISMO	21
2.3.1 Loxoscelismo cutâneo	22
2.3.2 Loxoscelismo sistêmico.....	23
2.4 O VENENO, SUAS MOLÉCULAS E MECANISMO DE AÇÃO	24
2.4.1 Enzimas com ação sobre componentes da matriz extracelular.....	25
2.4.2 Fosfolipases-D	26
2.5 TRATAMENTO.....	32
2.5.1 Vacinação.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 OBTENÇÃO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES</i> SP.	36
3.2 ANTÍGENOS: EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	36
3.3 ANTÍGENOS: ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESFINGOMIELINA	37
3.4 ANTÍGENOS: AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE (<i>WESTERN BLOT</i>)	38
3.5 ANIMAIS.....	38
3.5.1 Vacinação de coelhos e desafio com veneno: formulação vacinal 1 e 2.....	39
3.5.2 Vacinação de coelhos e desafio com veneno: formulação vacinal 3.....	40
3.5.3 Vacinação de coelhos: mensuração de edema (formulação 3).....	40
3.5.3 Vacinação de coelhos: análises hematológicas e bioquímicas (formulação 3)	40
3.5.4 Vacinação de camundongos e desafio com veneno: ensaio de letalidade	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 ANTÍGENOS: OBTENÇÃO, ATIVIDADE E RECONHECIMENTO.....	43
4.2 FORMULAÇÕES VACINAIS 1 E 2.....	46
4.2.1 Lesões cutâneas	46
4.3 FORMULAÇÃO VACINAL 3.....	51

4.3.1. Lesões cutâneas	51
4.3.2 Edema	55
4.3.3 Parâmetros sistêmicos	58
4.4 IMUNOGENICIDADE DAS FORMULAÇÕES 1, 2 E 3.....	63
4.5 VACINAÇÃO EM CAMUNDONGOS: PROTEÇÃO FRENTE AO LOXOSCELIISMO SISTÊMICO	65
5 DISCUSSÃO	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA	98
ANEXO 2 – ARTIGO.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, pertencentes a família *Sicariidae*, são popularmente conhecidas como aranhas marrons por apresentarem coloração que varia do marrom claro ao escuro (da SILVA *et al.*, 2004). As espécies de maior importância médica e mais frequentemente identificadas em acidentes são a *L. laeta* (encontrada em toda a América do Sul), *L. intermedia* (encontrada no Brasil e Argentina) e *L. gaucho* (encontrada no Brasil) (ISBISTER & FAN, 2011; FISCHER *et al.*, 2009; MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2005).

O grupo de sinais e sintomas desenvolvidos após o acidente com aranhas do gênero *Loxosceles* são chamados de loxoscelismo. O loxoscelismo é um problema de saúde pública no Brasil, com 7.992 casos e 9 óbitos notificados ao SINAN-MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde) no ano de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Este, apresenta-se de maneira cutânea ou dermonecrótica na maioria dos casos, porém, também pode se desenvolver como um quadro cutâneo-visceral ou sistêmico, onde ocorrem distúrbios hematológicos e renais que podem levar o acidentado à morte (ISBISTER & FAN, 2011; FUTRELL, 1992).

O veneno de *Loxosceles* sp. é formado por uma mistura complexa de toxinas ricas em proteínas, enzimas e peptídeos (GREMSKI *et al.*, 2014; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Dentre essas toxinas, destacam-se as fosfolipases-D (FLDs) ou toxinas dermonecróticas, enzimas capazes de hidrolisar um amplo espectro de fosfolipídios (APPEL *et al.*, 2008; LEE & LYNCH, 2005).

As FLDs são importantes ferramentas para entender o funcionamento do veneno de *Loxosceles*, isso porque sozinhas podem reproduzir experimentalmente a maioria dos sintomas do loxoscelismo cutâneo e sistêmico (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).

Apesar da importância desse envenenamento no Brasil e em outros países, ainda não existem critérios unânimes quanto ao melhor esquema terapêutico no tratamento do loxoscelismo e uma terapia definitiva ainda não foi estabelecida (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017; SWANSON & VETTER, 2006; HOGAN *et al.*, 2004).

Tendo em vista a necessidade de se pensar em métodos alternativos aos já existentes, uma estratégia preventiva poderia ser aplicada em regiões onde o loxoscelismo é endêmico, em pessoas que já utilizaram qualquer soro heterólogo de origem equina (aumento do risco de reações adversas). Porém, devido à alta toxicidade do veneno bruto de *Loxosceles* ou formas ativas recombinantes de fosfolipases-D (FLDs) não é possível usá-los como antígenos nesse esquema preventivo. Para resolver esse problema, o uso de FLDs recombinantes mutadas inativas apresenta-se como uma alternativa para gerar vacinas protetivas frente ao loxoscelismo.

Além da estratégia preventiva, o uso de FLDs inativas poderia ser aplicado para o desenvolvimento de uma soroterapia de segunda geração ou otimização da soroterapia comercial já existente. Isso porque são relatados alguns problemas na produção do anti-soro comercial, como a obtenção do veneno loxoscélico e o sofrimento dos animais produtores (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Estudos anteriores já suportam o uso de imunógenos alternativos em vacinação e na produção de soro-antilooscélico e demonstraram o potencial antigênico das FLDs (LIMA *et al.*, 2018; DIAS-LOPES *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; FELICORI *et al.*, 2009; OLVERA *et al.*, 2006; ALVARENGA *et al.*, 2003; ARAUJO *et al.*, 2003; BARBARO *et al.*, 1994).

Alguns trabalhos mostram que utilização de antígenos altamente purificados como por exemplo proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos geralmente possuem poucos componentes imuno-estimulatórios (NABEL, 2013; REED *et al.*, 2013). Para aumentar a resposta imunológica gerada são usados adjuvantes, como por exemplo o Hidróxido de Alumínio, adjuvante mais utilizado em vacinas de uso humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Por esse motivo, a formulação vacinal testada no presente estudo consiste na combinação de FLDs mutadas recombinantes e Hidróxido de Alumínio.

O desenvolvimento de uma vacina antilooscélica representaria um grande impacto sobre a saúde pública brasileira, uma vez que, sendo distribuída gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) auxiliaria na diminuição dos danos causados pelo loxoscelismo no país, principalmente em áreas endêmicas, como o estado do Paraná.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Verificar a eficácia de uma vacinação em proteger animais contra os danos causados pelo veneno de *Loxosceles* utilizando fosfolipases-D inativas de diferentes espécies loxoscélicas como antígenos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar fosfolipases-D mutadas na forma recombinante com mutações sítio dirigidas (LiRecDT1Y228A, LIRecDT1H12/H47A e LgRecDT1E32/D34A) e avaliar suas atividades fosfolipásicas, biológicas e imunogênicas;
- Avaliar a imunogenicidade de fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígenos de uma vacina;
- Avaliar a capacidade da vacinação em induzir a secreção de anticorpos neutralizantes frente ao loxoscelismo cutâneo (dermonecrose em coelhos) e sistêmico (letalidade de camundongos e danos renais, hepáticos e alterações hematológicas de coelhos).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LOXOSCELES SP.

As aranhas do gênero *Loxosceles*, pertencentes a família *Sicariidae*, são popularmente conhecidas como aranhas marrom por apresentarem coloração que varia do marrom claro ao escuro, conforme a FIGURA 1 (DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2014).

FIGURA 1 - ARANHAS MARROM ADULTAS. A) *Loxosceles gaucho*, B) *Loxosceles intermedia* E C) *Loxosceles laeta*.



FONTE: Adaptado de (GREMSKI *et al.*, 2014).

Adaptadas à distintas condições ambientais do globo terrestre, este gênero possui 156 espécies amplamente distribuídas pelo mundo, estando presente nas Américas, Europa, África, Ásia e Oceania (WORLD SPIDER CATALOG, 2019; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019). Apenas na América do Sul encontram-se 54 espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*, dessas, 18 foram descritas no Brasil e encontram-se distribuídas pelo território nacional (WORLD SPIDER CATALOG, 2019).

Acidentes com seres humanos envolvendo o gênero *Loxosceles* foram relatados em diferentes regiões do planeta (SAUPE *et al.*, 2011; PERNET *et al.*, 2010; BUCARETCHI *et al.*, 2010; FUTRELL, 1992). As espécies de *Loxosceles* mais frequentemente identificadas em acidentes e com maior importância médica são: *L. laeta* (encontrada em toda a América do Sul), *L. intermedia* (encontrada no Brasil e Argentina) e *L. gaucho* (encontrada no Brasil) (ISBISTER & FAN, 2011; FISCHER *et al.*, 2009).

O acidente humano geralmente ocorre por compressão da aranha contra o corpo e a picada nem sempre é percebida pela pessoa por ser pouco dolorosa, a dor

pode iniciar várias horas depois. A quantidade de veneno injetada no momento da picada é pequena, em média apenas 4 microlitros contendo entre 6 a 100 microgramas de proteínas totais (FORRESTER *et al.*, 1978).

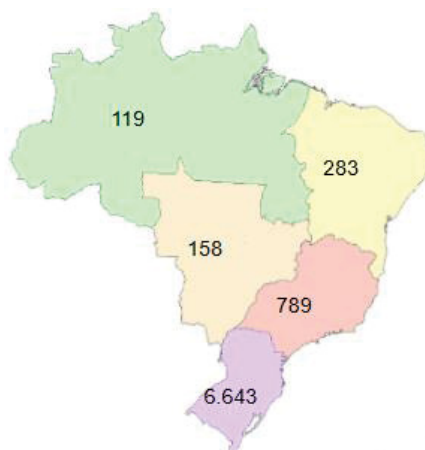
2.2 EPIDEMIOLOGIA

Devido ao elevado número de casos, acidentes com aranhas-marrom são um importante problema de saúde pública no Brasil e em outros países da América do Sul, como Chile e Peru (GREMSKI *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2013; PETERSON, 2006).

No Brasil, os gêneros de aranhas com importância em saúde pública são: *Loxosceles* (aranha marrom), *Phoneutria* (aranha armadeira) e *Latrodectus* (viúva-negra) (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRAZIL), 2001). Em 2017, foram notificados ao SINAN-MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde) 12.636 casos de acidentes envolvendo essas aranhas, desses, 13 evoluíram para óbito. Dos casos totais de araneísmo notificados, 7.992 foram casos de loxoscelismo e 9 desses acidentes evoluíram para óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Dados que indicam que os acidentes loxoscélicos são os casos de araneísmo mais numerosos e potencialmente fatais no Brasil.

Historicamente, o sul do país registra a maior parcela dos casos de loxoscelismo. Em 2017 aproximadamente 83% dos casos notificados ocorreram nessa região (FIGURA 4). Sendo que, desses casos, 4.085 foram no estado do Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), dados que indicam uma região endêmica para esse tipo de acidente.

FIGURA 2 - Acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* sp. no Brasil no ano de 2017



FONTE: ADAPTADO DE MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS – SINAN NET, 2019.

Clinicamente, os casos de loxoscelismo são classificados como: leves, moderados e graves. Casos leves apresentam lesões inacterísticas sem alterações clínicas ou laboratoriais, só é possível confirmar como caso de loxoscelismo através da identificação da aranha no momento do acidente. A presença de lesão característica ou altamente sugestiva menor que 3 centímetros sem alterações clínicas ou laboratoriais caracteriza os casos moderados. Já os casos graves podem ser cutâneos e/ou sistêmicos. Quanto ao loxoscelismo cutâneo são considerados casos graves os que apresentam lesão característica com presença de placa marmórea maior que 3 centímetros. Já os casos graves de loxoscelismo sistêmico são caracterizados pela presença de hemólise, independente do tamanho da lesão cutânea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Quanto a classificação do caso clínico, das 7.992 notificações de loxoscelismo ao SINAN-MS, aproximadamente 21% dos casos foram considerados moderados (n= 1.687) e em torno de 1% dos casos foram considerados graves (n=109).

2.3 LOXOSCELISMO

O grupo de sinais e sintomas observados após uma picada de aranha marrom é chamado de loxoscelismo. Este pode se desenvolver de maneira cutânea ou dermonecrótica, podendo também apresentar um quadro cutâneo-visceral, conhecido como sistêmico, onde ocorrem distúrbios hematológicos e renais (ISBISTER & FAN, 2011; FUTRELL, 1992).

2.3.1 Loxoscelismo cutâneo

A maior parte dos casos de loxoscelismo (entre 84% a 97% dos casos) são cutâneos, quadro clínico diretamente relacionado ao local da picada e ocorre principalmente pelo efeito direto do veneno sobre os componentes da membrana celular, membrana basal e matriz extracelular (MACHADO *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 1992). A ativação do sistema complemento, migração maciça de leucócitos polimorfonucleares e a agregação plaquetária também estão relacionados a dermonecrose desenvolvida no quadro cutâneo (MACHADO *et al.*, 2005).

Dentre os sintomas clínicos relatados estão: Dor local, ardência, prurido, edema, mal-estar e febre (FUTRELL, 1992). O local da picada apresenta edema, eritema, equimose, isquemia do tecido local e lesões dermonecroticas com espalhamento gravitacional, conforme mostra a figura 3 (ISBISTER & FAN, 2011). Perda tecidual, cicatrizes desfigurantes e infecções secundárias são as principais complicações do quadro clínico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

FIGURA 3 - Progressão do loxoscelismo cutâneo. A- 1 dia; B- 9 dias; C- 16 dias D- 25 dias.



FONTE: Isbister & Fan (2011).

Por apresentarem achados clínicos e laboratoriais semelhantes aos acidentes com humanos, coelhos vem sendo utilizados como modelos animais para o estudo do loxoscelismo (FUTRELL, 1992). Pouco tempo após a inoculação de veneno de *L. intermedia*, coelhos apresentam lesões cutâneas e até 4 dias após é observada a extensão máxima da lesão dermonecrotica (PAULI *et al.*, 2009). Achados histopatológicos nesses animais demonstraram a instalação de um quadro classificado como necrose coagulativa asséptica, que ocorre entre 24 horas a 5 dias.

Neste quadro estão presentes: infiltração maciça de neutrófilos na derme e até no tecido muscular subcutâneo, destruição dos vasos sanguíneos, trombose, hemorragia, mionecrose e necrose coagulativa no sangue (OSPEDAL *et al.*, 2002).

2.3.2 Loxoscelismo sistêmico

Quando o veneno atravessa a barreira da pele e alcança a circulação sanguínea ocorre um quadro clínico denominado de loxoscelismo sistêmico. Este, é muito menos comum do que o loxoscelismo cutâneo, ocorre em apenas 3 a 16% dos casos, porém é potencialmente mais severo (BARBARO *et al.*, 1992; FUTRELL, 1992).

Clinicamente, o quadro sistêmico é caracterizado por coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular (responsável pelo desenvolvimento de anemia hemolítica, hemoglobinúria e icterícia) e insuficiência renal aguda (IRA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; FUTRELL, 1992). Alterações vasculares, nos pulmões e fígado também podem ocorrer (LUNG & MALLORY, 2000). Além disso, são passíveis de serem encontrados: *rash* cutâneo, petéquias, equimose, astenia, trombocitopenia, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaleias, obnubilação, convulsões e coma (NGUYEN & PANDEY, 2019). A lesão dermonecrótica também pode estar presente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; FUTRELL, 1992).

O principal fator que pode causar complicações é a IRA podendo até mesmo levar os pacientes a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). A IRA caracteriza-se por hemoglobinúria, hematúria e proteinúria e em casos extremos pode levar a obstrução da luz tubular por acúmulo de proteínas ou pelo edema das células epiteliais (LUNG & MALLORY, 2000; FUTRELL, 1992).

Distúrbios hematológicos também são descritos no loxoscelismo sistêmico. Exames laboratoriais de acidentados podem indicar hemoglobinemia, bilirrubina elevada, hemoglobinúria, leucocitose e proteinúria (FUTRELL, 1992).

Coelhos inoculados experimentalmente com veneno de *L. intermedia* mostraram que os primeiros parâmetros sistêmicos alterados pelo veneno foram a diminuição da contagem de plaquetas e aumento dos níveis de fibrinogênio. Além disso, uma intensa leucopenia, neutropenia e diminuição na série vermelha do sangue também foram observadas (PAULI *et al.*, 2009).

A maioria dos casos fatais de loxoscelismo ocorre em crianças e/ou estão associados a espécies como *L. laeta*, que possuem venenos possivelmente mais letais (de OLIVEIRA *et al.*, 2005; GONÇALVES-DE-ANDRADE & TAMBOURGI, 2003; FUTRELL, 1992). Índices de letalidade de 3,6% foram descritos para os acidentes envolvendo *L. laeta*, enquanto acidentes envolvendo *L. intermedia* apresentaram índices de letalidade entre 0,2 a 0,4% dos casos (SCHENONE, 2003; MARQUES-DASILVA, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1993).

Fatores como a espécie, sexo e estágio de desenvolvimento da aranha envolvida no acidente, quantidade de veneno inoculado e o tempo com que o acidentado leva para obter tratamento adequado podem estar diretamente relacionados com a gravidade do acidente (PAULI *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; SEZERINO *et al.*, 1998).

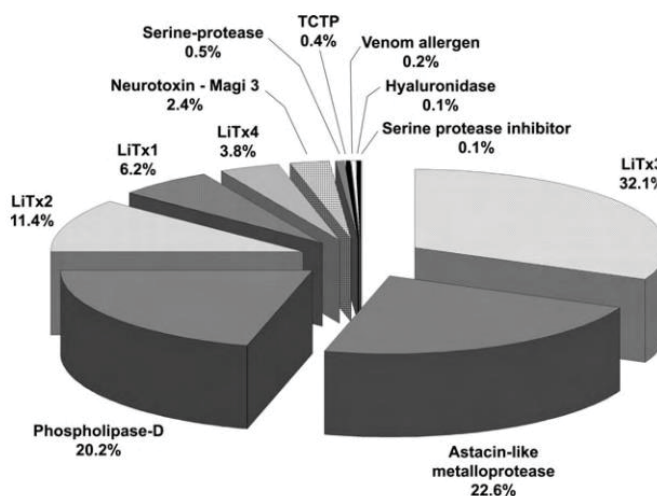
2.4 O VENENO, SUAS MOLÉCULAS E MECANISMO DE AÇÃO

O veneno de *Loxosceles* é um líquido cristalino e incolor formado por uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, enzimas, moléculas orgânicas e peptídeos biologicamente ativos, com predominância de proteínas de baixa massa molecular, entre 5 a 40 kDa (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019; GREMSKI *et al.*, 2014; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Juntas, essas moléculas interagem com alvos celulares e moleculares para desencadear os sinais e sintomas do loxoscelismo cutâneo e sistêmico.

Até o momento, já foram descritas diversas moléculas no veneno loxoscélico, dentre essas, destacam-se: as fosfolipases-D, peptídeos com atividade inseticida e as proteases, como as hialuronidases, serinoproteases e metaloproteases (GREMSKI *et al.*, 2014; GREMSKI *et al.*, 2010).

O perfil de transcritos da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* revelou que aproximadamente 43,5% dos transcritos correspondem a toxinas (GREMSKI *et al.*, 2010). Dentre essas toxinas as com maior porcentagem de transcritos correspondem a: LiTx3 (32,1%), peptídeos com função inseticida, metaloproteases (22,6%) e fosfolipases-D (20,2%) (FIGURA 4) (GREMSKI *et al.*, 2010).

FIGURA 4 - Proporção relativa de cada grupo de toxinas sobre o total de transcritos de toxinas.



Fonte: GREMSKI *et al.*, 2010.

2.4.1 Enzimas com ação sobre componentes da matriz extracelular

Os sintomas desenvolvidos no loxoscelismo cutâneo e sistêmico estão principalmente relacionados à ação das toxinas sobre componentes da matriz extracelular (MEC) e sobre a superfície de células (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2000b).

A degradação da MEC é um evento desencadeado pela ação de proteases e glicosidases. Diversas enzimas com esse tipo de atividade no veneno loxoscélico já foram descritas e caracterizadas, são essas: as metaloproteases (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; FEITOSA *et al.*, 1998), serinoproteases (VEIGA *et al.*, 2000) e hialuronidases (FERRER *et al.*, 2013).

Metaloproteases encontradas no veneno loxoscélico são endopeptidases dependentes de zinco e são capazes de hidrolisar um amplo espectro de moléculas da MEC (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; YOUNG & PINCUS, 2001; FEITOSA *et al.*, 1998). Experimentalmente, uma forma recombinante de metaloprotease do veneno de *Loxosceles*, além de clivar componentes da MEC também foi capaz de induzir alterações morfológicas em células, como perda de adesão (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b).

Apesar de pouco expressas no veneno loxoscélico (FIGURA 4), as hialuronidases apresentam um papel importante no loxoscelismo. Uma isoforma recombinante do veneno de *L. intermedia* apresentou capacidade de hidrolisar dois

dos constituintes da MEC, o ácido hialurônico e o condroitin sulfato (FERRER *et al.*, 2013).

A desorganização da MEC causada pela associação de enzimas do veneno loxoscélico que degradam seus componentes está diretamente relacionada com os sinais e sintomas do loxoscelismo. Essas moléculas participam do espalhamento de outras toxinas, provocando um aumento do tamanho da lesão e também participam da formação da hemorragia local, eventos observados no loxoscelismo cutâneo (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 2013).

Além de serem responsáveis por espalhar o veneno aos locais periféricos a picada, essas enzimas parecem possibilitar a chegada do veneno à circulação sanguínea, evento primordial para o desenvolvimento do loxoscelismo sistêmico (FERRER *et al.*, 2013; DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

2.4.2 Fosfolipases-D

Devido a sua principal atividade biológica as fosfolipases-D (FLDs) loxoscélicas já foram denominadas de fator/proteína dermonecrótica (ATKINS *et al.*, 1957). Ainda, por apresentarem capacidade de hidrolisar esfingomielina, também já foram descritas como esfingomielinases D (SMase D) (FORRESTER *et al.*, 1978; KURPIEWSKI *et al.*, 1981). Porém, estudos revelaram que essas toxinas são capazes de hidrolisar um amplo espectro de fosfolipídeos, tornando o termo fosfolipases-D mais apropriado para descrevê-las (LEE & LYNCH, 2005).

As FLDs são consideradas isoformas ou homólogas de uma mesma enzima, compondo uma família de toxinas denominada de Loxtox (*Loxosceles toxin*) (MACHADO *et al.*, 2005). Ainda, estudos filogenéticos levaram à proposição de uma nova nomenclatura para essa família de genes denominando-os de *SicTox* (*Sicariidae Toxin*) (BINFORD *et al.*, 2009).

Estudos dos transcritos da glândula de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. simillis* revelaram que as sequências codificantes de fosfolipases-D perfazem entre 15 a 20% dos transcritos de toxinas (DANTAS *et al.*, 2016; GREMSKI *et al.*, 2010; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Apesar de não serem as moléculas mais expressas no veneno, as FLDs são importantes alvos de estudo para entender o funcionamento do veneno de *Loxosceles*. Isso porque, sozinhas podem reproduzir

experimentalmente a maioria dos sintomas do loxoscelismo cutâneo e sistêmico (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).

Fosfolipases-D purificadas diretamente do veneno de *L. intermedia* demonstraram atividade fosfolipásica e biológica (dermonecrose e hemólise dependente de sistema complemento) (TAMBOURGI *et al.*, 1998). Porém, devido a pequena quantidade de veneno produzido pela aranha marrom, dificuldade de captura e dificuldade de purificação da FLDs do veneno, estratégias de clonagem e expressão heteróloga de proteínas vêm sendo empregadas a fim de expandir os conhecimentos sobre elas.

Oito diferentes isoformas de fosfolipases-D de *L. intermedia* já foram identificadas, clonadas e caracterizadas, e a maioria foi nomeada como LiRecDT (*Loxosceles intermedia recombinant dermonecrotic toxin*). Dentre essas, LiRecDT1 é a que apresenta maior atividade biológica (CHAIM *et al.*, 2006). Fosfolipases-D de *L. gaucho* e *L. laeta* com atividade biológica também já foram clonadas e expressas em sistema procarioto (MAGALHÃES *et al.*, 2013; FERNANDES PEDROSA *et al.*, 2002).

Todas as FLDs recombinantes que apresentam atividade esfingomielinásica *in vitro* também são capazes de desencadear os principais sinais e sintomas observados após o envenenamento loxoscélico (GREMSKI *et al.*, 2020). Experimentalmente, essas enzimas foram relacionadas com: dermonecrose, edema, eritema, massiva resposta inflamatória com infiltração de neutrófilos, hemólise, agregação plaquetária, distúrbios renais, nefrotoxicidade, citotoxicidade. A tabela 1 resume as atividades de FLDs de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* já descritas na literatura.

TABELA 1 – Fosfolipases-D loxoscélicas recombinantes e suas atividades.

Dermonecrose	<i>L. laeta</i> Smase I (FERNANDES-PEDROSA <i>et al.</i> , 2002) LiRecDT1 (CHAIM <i>et al.</i> , 2006); LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006 a); LiRecDT5 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008); LiRecDT7 (VUITIKA <i>et al.</i> , 2013) LgRec1 (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2013).
Edema	<i>L. laeta</i> Smase I (FERNANDES-PEDROSA <i>et al.</i> , 2002) LiRecDT1 (CHAIM <i>et al.</i> , 2006); LiRecDT3 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006 a); LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008); LiRecDT7 (VUITIKA <i>et al.</i> , 2013); LgRec1 (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2013).
Eritema	<i>L. laeta</i> Smase I (FERNANDES-PEDROSA <i>et al.</i> , 2002) LiRecDT1 (CHAIM <i>et al.</i> , 2006); LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006 a); LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008); LgRec1 (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2013) LiRecDT7 (VUITIKA <i>et al.</i> , 2013).
Espalhamento gravitacional	<i>L. laeta</i> Smase I (FERNANDES-PEDROSA <i>et al.</i> , 2002) LiRecDT2 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006 a); LiRecDT4 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008).
Hemólise	<i>L. laeta</i> Smase I (FERNANDES-PEDROSA <i>et al.</i> , 2002); LiRecDT7 (VUITIKA <i>et al.</i> , 2013); LgRec1 (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2013).
Agregação Plaquetária	LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006 a); LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008); LgRec1 (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2013).
Distúrbios Renais	LiRecDT1 (CHAIM <i>et al.</i> , 2006).
Citotoxicidade	LiRecDT1 (CHAIM <i>et al.</i> , 2006).
Alteração na permeabilidade vascular	LiRecDT1 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006 a); LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006b); LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008); LiRecDT7 (VUITIKA <i>et al.</i> , 2013).
Letalidade em camundongo	LiRecDT6 (APPEL <i>et al.</i> , 2008).

FONTE: A autora

O uso dessas FLDs recombinantes permitiu o esclarecimento de muitas das suas atividades. Muitos trabalhos mostram que essas toxinas podem catalisar a hidrólise de lipídeos de membrana liberando metabólitos bioativos, que seriam responsáveis por promover diversas atividades biológicas (GREMSKI *et al.*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005).

Estudos sobre os efeitos de FLDs em membranas artificiais concluíram que a transformação dos fosfolipídeos em derivados lipídicos nas membranas altera a

estrutura e morfologia da membrana (STOCK *et al.*, 2012).

As FLDs loxoscélicas possuem especificidade por diferentes substratos lipídicos de membrana como a esfingomielina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina entre outros. Com preferência para esfingomielina (SM) e lisofosfatidilcolina (LPC), que quando clivadas pelas FLDs produzem ceramida-1-fostato e ácido lisofosfatídico, respectivamente (LAJOIE *et al.*, 2015; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005). Esses derivados lipídicos são descritos principalmente como mediadores de resposta inflamatória (LAJOIE *et al.*, 2015; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005).

Os mecanismos pelos quais as FLDs atuam ainda são pouco conhecidos (GREMSKI *et al.*, 2020). Apesar disso, a ativação dos mediadores de resposta inflamatória parece ser a chave principal na fisiopatologia do envenenamento. A dermonecrose, por exemplo, parece ser causada pela ativação desregulada de uma resposta inflamatória local, o que leva a uma ativação descontrolada de neutrófilos, etapa central para o desencadeamento da dermonecrose em tecidos (GREMSKI *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2004).

Estudos da histologia de biópsias da pele de coelhos inoculados experimentalmente com FLDs (LiRecDT1) demonstraram que, 24 horas após a inoculação há um acúmulo intenso de células inflamatórias no local, desorganização das fibras de colágeno na derme (edema) e presença de deposição de fibrina no tecido conjuntivo (FERRER *et al.*, 2013; CHAIM *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a). Macroscopicamente, LiRecDT1 foi capaz de desenvolver dermonecrose e edema. No entanto, a exposição dos animais à LiRecDT1 H12A (FLD mutada recombinante) produziu uma resposta inflamatória residual, sem sinais de dermonecrose macroscopicamente (CHAIM *et al.*, 2009). VUITIKA e colaboradores (2016) também salientaram a importância da atividade fosfolipásica das FLDs na promoção dos sinais do loxoscelismo cutâneo promovido por essas moléculas utilizando diversas FLDs mutadas recombinantes inativas.

Ainda há poucos trabalhos no que se diz respeito ao ambiente celular dos tecidos afetados pelas FLDs, com quais células essas enzimas interagem e como alteram as membranas celulares (GREMSKI *et al.*, 2020). Porém, é de conhecimento que essas enzimas podem ter atuação sobre alguns tipos celulares. Estudos em membranas artificiais sugerem que os efeitos das FLDs são dependentes da

composição lipídica, explicando por que células diferentes sofrem ações diferentes pelas FLDs (STOCK *et al.*, 2012).

Acredita-se que as FLDs tenham ação principalmente sobre células endoteliais (GREMSKI *et al.*, 2014; CHAIM *et al.*, 2011). Porém, também já foram demonstradas atividades sobre fibroblastos, plaquetas e eritrócitos (HORTA *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a).

Estudos *in vitro* demonstraram a citotoxicidade direta de FLDs (LiRecDT1) sobre células RAEC (células epiteliais da aorta de coelho). Neste estudo, foram observadas mudanças morfológicas nessas células, como a vacuolização do citoplasma, restos celulares decorrentes de lise celular e alteração da adesão célula-célula e substrato-célula (CHAIM *et al.*, 2009). O mesmo estudo, comprovou que a citotoxicidade é dependente da atividade fosfolipásica usando uma FLD mutada recombinante sem atividade fosfolipásica (LiRecDT1H12A) (CHAIM *et al.*, 2009).

Quanto aos eritrócitos, já é de conhecimento que as FLDs são capazes de se ligar à superfície dos eritrócitos, estimulando a formação de agregados lipídicos e, em alguns casos, perturbando a integridade dessa estrutura (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009). Além disso, sozinhos, os produtos da degradação de LPC e SM são capazes de causar hemólise em eritrócitos humanos através da estimulação de um influxo de cálcio mediado por canais do tipo L (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Além da ação das FLDs sobre os fosfolipídeos de membrana, a hemólise também é relacionada com a ativação do Sistema Complemento. Isso porque a ação esfingomielinásica das FLDs ativa metaloproteinases endógenas que removem glicoforinas da membrana de eritrócitos, facilitando a ação do Sistema Complemento autólogo, gerando hemólise (TAMBOURGI *et al.*, 2000). Ainda, VUITIKA e colaboradores (2016) usando FLDs mutadas recombinantes sem atividade fosfolipásica demonstraram a necessidade da degradação dos fosfolipídeos na promoção da hemólise.

A hemoglobina plasmática liberada durante a hemólise intravascular disseminada é considerada um dos principais fatores que levam à insuficiência renal no loxoscelismo sistêmico (KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006; MÁLAQUE *et al.*, 2002; FUTRELL, 1992). Porém, estudos demonstraram que as FLDs tem atividade nefrotóxica direta sobre os tecidos renais de camundongos, tal qual o veneno bruto, sugerindo que essas moléculas são capazes de desencadear os danos renais diretamente (KUSMA *et al.*, 2008). Neste estudo foram observadas alterações

histológicas nos glomérulos e túbulos renais, além de um aumento da ureia no sangue e proteinúria (KUSMA *et al.*, 2008). O mesmo não foi observado quando uma FLD mutada recombinante sem atividade fosfolipásica foi utilizada, salientando a necessidade da catálise dos fosfolipídeos para a ação nefrotóxica das FLDs (KUSMA *et al.*, 2008).

Análises cristalográficas de FLDs de *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho* desvendaram a estrutura destas proteínas e mostraram que as FLDs dos venenos loxoscélicos apresentam uma única cadeia polipeptídica com 280 a 285 aminoácidos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002). Sua estrutura tridimensional é composta de oito folhas- β que estão intercaladas entre oito α -hélices, formando uma estrutura em barril chamada de $(\alpha/\beta)_8$ barril (MURAKAMI *et al.*, 2006; MURAKAMI *et al.*, 2005).

O loop catalítico é estabilizado por uma ponte dissulfeto (Cys51 e Cys57) em FLDs de classe I (*L. laeta*) e em FLDs de classe II uma segunda ponte dissulfeto é formada (Cys53 e Cys201) (CORONADO *et al.*, 2015; DE GIUSEPPE *et al.*, 2011; MURAKAMI *et al.*, 2005).

O loop catalítico, o loop flexível e o loop variável formam a face interfacial (i-face) da enzima onde o sítio ativo está localizado. No sítio ativo, nos sítios catalíticos e em um sítio de ligação à Mg^{2+} estão localizados resíduos de aminoácidos cataliticamente ativos como His12, Glu32, Asp34, Asp91, His47, Asp52, Trp230, Asp233, Tyr228 e Asn252. Todos esses, altamente conservados em todas as fosfolipases-D loxoscélicas estudadas até o momento (VUITIKA *et al.*, 2016; GREMSKI *et al.*, 2014 MURAKAMI *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação das FLDs loxoscélicas ainda não é totalmente elucidado, ainda não se sabe como essas enzimas ligam-se às células, quais membranas celulares são capazes de alterar e a diferença da ação das FLDs sobre diferentes tipos celulares. Apesar disso, análises estruturais já demonstraram os resíduos de aminoácidos ativos nessas enzimas.

Os aminoácidos His12 e His47 estão diretamente envolvidos na atividade catalítica das FLDs, enquanto o aminoácido His47 atua na ligação fosfodiéster liberadora de colina, o resíduo His12 participa da formação da ceramida-1-fosfato, produto da degradação da esfingomielina (MURAKAMI *et al.*, 2005). Os aminoácidos Glu32 e Asp34 e 91 estão envolvidos na coordenação de um íon magnésio (Mg^{2+}) nessas enzimas, íon envolvido no reconhecimento e ligação dos substratos clivados

por FLDs e estabilização do complexo enzima-substrato (MASOOD *et al.*, 2018; GREMSKI *et al.*, 2014; MURAKAMI *et al.*, 2005). Após a ligação ao substrato, Tyr228 altera sua conformação e ajuda a orientar substrato-ligante para sua posição específica (MASOOD *et al.*, 2018; MURAKAMI *et al.*, 2005).

Mutações sítio dirigidas em aminoácidos do sítio ativo, sítio catalítico e sítio de ligação à Mg^{2+} ajudaram a compreender o mecanismo de ação dessas FLDs sugeridos pelas análises estruturais.

As isoformas mutadas recombinantes de FLD H12A, H12A-H47A, D34A-E32A e Y228A, todas de *L. intermedia*, nas quais os aminoácidos alvo foram substituídos por alanina, produziram proteínas apenas com atividade residual para catálise da esfingomielina e lisofosfatidilcolina (VUITIKA *et al.*, 2016; CHAIM *et al.*, 2011). Biologicamente, essas enzimas perderam ou reduziram drasticamente a capacidade de produzir dermonecrose, permeabilidade vascular, hemólise, nefrotoxicidade e citotoxicidade (VUITIKA *et al.*, 2016; CHAIM *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; KUSMA *et al.*, 2008).

Anticorpos produzidos contra o veneno bruto de *Loxosceles* são capazes de reconhecer FLDs mutadas recombinantes demonstrando o potencial antigênico dessas proteínas (VUITIKA *et al.*, 2016; CHAIM *et al.*, 2011). Isso, aliado à inatividade catalítica e biológica dessas enzimas as torna um alvo promissor para a terapêutica do loxoscelismo.

2.5 TRATAMENTO

O loxoscelismo é um problema clínico ainda não resolvido. Os tratamentos para lesões locais são baseados em esteróides, dapsona, antibióticos, terapia sérica anti-veneno e excisão cirúrgica, mas reduzem o problema apenas quando administrados nas primeiras horas pós-envenenamento (PAULI *et al.*, 2009; SWANSON & VETTER, 2006; FUTRELL, 1992). No entanto, as pesquisas sobre o tratamento do loxoscelismo são inconclusivas e não geram evidências que suportem esses tratamentos (SWANSON & VETTER, 2006; HOGAN *et al.*, 2004; WENDELL, 2003).

O soro antiveneno é o único tratamento específico frente ao loxoscelismo. No Brasil, um soro trivalente antiloxoscélico é produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), e contém anticorpos específicos contra o veneno de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*. Ainda, um soro mais geral, chamado

de antiaracnídico é produzido pelo Instituto Butantan e contém anticorpos contra as toxinas dos venenos dos gêneros *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Tityus*. O Ministério da Saúde brasileiro recomenda o uso do soro antiveneno em casos moderados e graves de loxoscelismo, na presença de doença sistêmica, e também para diminuir a gravidade da lesão dermonecrotica e reduzir o tempo de cicatrização (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRAZIL), 2001).

Estudos de potência em coelho demonstraram que o soro antiloxoscélico é capaz de minimizar de forma efetiva os efeitos da ação do veneno quando utilizado em até 48 horas após o acidente (PAULI *et al.*, 2009). Apesar disso, a eficácia da administração do antiveneno diminui bastante após 12 horas do acidente (PAULI *et al.*, 2009). Porém existem poucas evidências para apoiar essa eficácia, especialmente contra o loxoscelismo cutâneo (ISBISTER & FAN, 2011; LOVRECEK & TOMIĆ, 2011).

Pela característica indolor da picada, dificilmente o acidentado busca ajuda médica nas primeiras horas pós-acidente. Geralmente, os sintomas começam algumas horas após a picada, acentuando-se em torno de 24 a 72 horas, quando os pacientes então procuram atendimento (PAULI *et al.*, 2006). A dificuldade de diagnóstico preciso pelas equipes médicas dificulta ainda mais o uso deste soro no tempo adequado (DA SILVA *et al.*, 2004).

O soro antiloxoscélico é composto de imunoglobulinas heterólogas, fração F(ab')₂ de origem equina, portanto, não se trata de um tratamento isento de riscos (HOGAN *et al.*, 2004). Dentre as manifestações leves causadas pela administração de antiveneno estão: eritema, urticária, náuseas, vômito e crise asmátiforme (LOVRECEK & TOMIĆ, 2011).

Reações mais graves e mais raras são representadas por arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque anafilático e quadro obstrutivo das vias respiratórias; Reações tardias, como a doença do soro, também podem estar presentes (LOVRECEK & TOMIĆ, 2011). Ainda, doses complementares podem ser necessárias, aumentando ainda mais o risco dessas reações (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRAZIL), 2001).

Alguns fatores também são indicados como impeditivos para o uso de soros antiveneno: paciente com quadros anteriores de hipersensibilidade, uso prévio de soros de origem equina e contato frequente com equinos (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2014), o que torna algumas pessoas excluídas do único tratamento disponível.

Além das reações indesejáveis provocadas em humanos, existem dificuldades ainda na produção dos soros, quanto ao uso de grandes quantidades de veneno para a imunização e nos testes de potência pré-clínica do soro produzido, assim como também é relatado na literatura sofrimento dos animais que são expostos ao veneno para produção do soro (FIGUEIREDO et al., 2014).

A busca por imunógenos alternativos tem crescido muito nos últimos anos para tentar resolver os problemas relatados. Olvera e colaboradores (2006) e Almeida e colaboradores (2008) (patente nº. 0404765-6– 020040006198; 3/11/2004, - Instituto Nacional de Propriedade Industrial, INPI, 2005) produziram soros anti loxoscélicos por meio de misturas de FLDs recombinantes que demonstraram alta capacidade de neutralização dos efeitos causados pelo veneno total. Estudos estes que sustentam o uso de FLDs como imunógenos para o tratamento do loxoscelismo e que propõem uma solução para o problema da obtenção de grandes quantidades de veneno, porém que não se atentam à sem resolução do sofrimento dos animais produtores.

Recentemente, Figueiredo e colaboradores (2014) usaram uma proteína quimera não tóxica (rCpLi) contendo epítomos de PLD para produzir soro antiloxoscélico. O esquema de imunização foi combinado com doses iniciais de veneno bruto de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* e produziu um soro com capacidade de atender os requisitos de potência para permitir seu uso em humanos usando 67% a menos de veneno que o protocolo tradicional de imunização.

2.5.1 Vacinação

No Brasil, desde o início do século XIX, as vacinas são utilizadas como medida de controle de doenças. Vacinas são imunobiológicos capazes de estimular a produção de anticorpos específicos e a produção de células de memória. Tais células permitirão a rápida produção de anticorpos específicos no momento da exposição ao agente causador da doença. Assim, na reexposição, a resposta será mais rápida e mais potente, prevenindo a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Devido aos problemas relatados com o soro antiveneno há uma crescente procura por novos tratamentos para o loxoscelismo, como ao exemplo da estratégia de pré exposição. O uso de imunógenos alternativos tem mostrado ampla aplicação em testes de vacinas protetivas contra o veneno loxoscélico. Recentemente, Lima e

colaboradores (2018) usando uma proteína quimérica recombinante (rMEPLox) contendo epítomos de FLD, hialuronidase e metaloprotease relataram que a vacinação com rMEPLox foi capaz de evitar o desenvolvimento de dermonecrose em 100% dos coelhos e protegeu 60% dos camundongos frente a 2DL50 de veneno de *L. intermedia*.

O uso de FLDs completas como antígenos ou epítomos selecionados dessa proteína também demonstrou capacidade de induzir respostas de anticorpos capazes de neutralizar eficientemente os efeitos tóxicos do veneno. Araújo e colaboradores (2003) usaram uma PLD recombinante fusionada com β -galactosidase como antígeno para a vacinação de coelhos e camundongos. Essa proteína, chamada de Li-rec, foi capaz de causar um efeito protetivo a longo prazo em coelhos frente a atividade dermonecrótica do veneno bruto e proteger camundongos contra 2,5 DL50 de veneno.

Felicori e colaboradores (2009) vacinaram coelhos com peptídeos sintéticos e com uma PLD recombinante (LiD1r) e constataram que ambos antígenos foram capazes de evitar dermonecrose, hemorragia e edema induzidos por LiD1, porém o uso da proteína recombinante inteira apresentou resultados muito superiores ao peptídeo sintético.

Anticorpos produzidos contra o veneno bruto de *Loxosceles* são capazes de reconhecer FLDs recombinantes, demonstrando o potencial antigênico dessas proteínas (DIAS-LOPES, 2014; ALVARENGA, 2003; BARBARO, 1994). Estes resultados incentivam o uso de imunógenos alternativos para produzir antivenenos terapêuticos ou em formulação de vacinas para tratamento ou proteção contra envenenamento loxoscélico.

A utilização de antígenos altamente purificados obtidos a partir de tecnologia de DNA recombinante ou o uso peptídeos sintéticos em detrimento ao uso de microrganismos completos já vem sendo empregadas em diferentes vacinas por serem uma alternativa mais segura (KONDAKOVA *et al.*, 2019; NABEL, 2013). Contudo, por possuírem menos componentes imunoestimulatórios, essas formulações geralmente são pouco imunogênicas (NABEL, 2013; REED *et al.*, 2013). Para aumentar a resposta gerada por estes antígenos é necessário o uso de substâncias com efeito adjuvante (KONDAKOVA *et al.*, 2019; TANDRUP SCHMIDT *et al.*, 2016; NABEL, 2013; REED *et al.*, 2013).

Dentre os adjuvantes disponíveis no mercado destacam-se os baseados em sais de alumínio. Dentre esses, o Hidróxido de Alumínio é o mais utilizado em vacinas

para humanos e possui um bom histórico de segurança (WEN & SHI, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Apesar disso, seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado (WEN & SHI, 2016).

Já foi demonstrado que o uso desse adjuvante melhora a produção de anticorpos e estimula a imunidade inata, estimulando a diferenciação de macrófagos em células apresentadoras de antígenos especializadas, além de estimular a migração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e diversos tipos celulares da imunidade inata para o local da injeção (RIMANIOL *et al.*, 2004). Ainda, estudos sugerem que os antígenos liguem-se às partículas do adjuvante e que isso faz com que eles sejam internalizados mais rapidamente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (DE GREGORIO *et al.*, 2013)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO VENENO DE *LOXOSCELES* SP.

Os venenos totais de *Loxosceles intermedia*, *L. gauchoi* e *L. laeta* foram cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). Os aracnídeos foram capturados em diferentes regiões dos estados do Paraná e Santa Catarina (autorizações de captura no 03/2015 – Ditec/IBAMA/SC, 090/2015, 109/2015, 06/2016 – Ditec/IBAMA/SC, 066/2016 e 128/2016 cedidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA). A extração do veneno total foi realizada através de eletrochoque e o veneno obtido foi dissecado a vácuo, pesado e ressuspensionado em solução salina estéril 0,85% em uma concentração de 1 mg/mL. A dosagem das proteínas totais do veneno, bem como das proteínas utilizadas no presente estudo foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Bradford (BRADFORD, 1976).

3.2 ANTÍGENOS: EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

Preparações plasmidiais (“*minipreps*”) dos clones das fosfolipases-D com mutações sítio dirigidas LiRecDT1Y228A, LiRecDT1H12-H47A e LgRecDT1E32-D34A, foram utilizadas para expressão e purificação conforme a demanda. A

construção da isoforma mutada recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1Y228A) foi realizada por VUITIKA e colaboradores (2016). Já a obtenção das construções de *L. laeta* (LiRecDT1H12/H47A) e *L. gaucho* (LgRecDT1E32A-D34A) é parte do trabalho de outro integrante do grupo de pesquisa (DADOS NÃO PUBLICADOS).

As construções em plasmídeo pET-14b foram transformadas em cepa bacteriana de expressão *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS quimiocompetente e plaqueadas em meio LB ágar contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Conforme verificado por VUITIKA e colaboradores (2016), o tempo ótimo de expressão da proteína LiRecDT1Y228A é de 3 h e 30 min à 30°C com uma concentração de 0,05 mM de indutor (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside - IPTG), LiRecDT1H12/H47A e LgRecDT1E32/D34A foram expressas sob as mesmas condições.

Após o período de expressão as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de ligação (Tampão fosfato 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0) e lisozima (1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -20°C por pelo menos 16 horas e lisada por lise ultra-sônica. O sobrenadante do lisado e o pellet foram separados em alíquotas para análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras.

A purificação das toxinas foi realizada com auxílio do sistema de cromatografia ÄKTA pure com coluna cromatográfica de afinidade HisTrap™ HP 1 mL pré empacotada com Ni Sepharose (G&E). A coluna foi equilibrada por 5 volumes de coluna com 20 mM de imidazol, o sobrenadante aplicado (10 mL) e lavado por 25 volumes de coluna com 20 mM de imidazol. A amostra foi eluída da coluna usando um gradiente de tampão de eluição (0 – 500 mM de imidazol); Tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 20 Mm; 500 mM NaCl) e tampão de eluição (NaH₂PO₄ 20 Mm; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol). As frações de eluição foram coletadas em tubos Eppendorf (1 mL) e o grau de pureza das frações do pico eluído foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras.

3.3 ANTÍGENOS: ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESFINGOMIELINA (AMPLEX RED)

Visando constatar atividade fosfolipásica das toxinas LiRecDT1Y228A, LiRecDT1H12/H47A e LgRecDT1E32/D34A em comparação com as toxinas selvagens, foi realizado ensaio *in vitro* com o kit *Amplex Red* (Molecular Probes,

Eugene, EUA). Neste ensaio, a atividade fosfolipásica foi monitorada usando 10-acetil-3,7- dihidroxifenoxazine (reagente *Amplex Red*), um reagente fluorogênico sensível para H₂O₂. Primeiramente, a fosfolipase-D hidrolisa a esfingomielina (substrato) à ceramida-1- fosfato e colina. A colina, por sua vez, é oxidada pela enzima colina oxidase à betaína e H₂O₂. Finalmente, a H₂O₂, na presença da peroxidase reage com o *Amplex Red* estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; APPEL *et al.*, 2008). Foram incubadas 100 µg das toxinas juntamente com o reagente *Amplex Red* a 37 °C por 30 minutos. Como controle negativo foi utilizado o reagente *Amplex Red* com a esfingomielina. Todas as amostras foram testadas em triplicata, sendo incubadas 37 °C por 30 minutos antes da leitura. A fluorescência foi mensurada em fluorímetro (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) usando comprimento de onda de excitação em 540 nm e emissão em 570 nm (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; APPEL *et al.*, 2008). Como controle positivo de hidrólise foram utilizadas as isoformas recombinantes selvagens (10 µg): LiRecDT1, LIRecDT1 e LgRecDT1.

3.4 ANTÍGENOS: AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE (WESTERN BLOT)

Para testar a capacidade imunogênica das fosfolipases-D mutadas recombinantes foram realizadas corridas eletroforéticas (SDS-PAGE 12,5%) de 2,5 µg das fosfolipases-D selvagens (LiRecDT1, LIRecDT1 e LgRecDT1) e mutadas (LiRecDT1Y228A, LIRecDT1H12/H47A e LgRecDT1E32/D34A). O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e incubado por 2 horas com soros pré imune e hiperimune de coelhos (1:1000) produzidos contra o veneno total de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:5000) conjugado à fosfatase alcalina e reveladas com substrato BCIP e o cromógeno NBT em tampão ótimo para fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM).

3.5 ANIMAIS

Experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto em questão foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de

Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) sob certificado de número 1205. Foram utilizados coelhos albinos (New Zealand) com peso a partir de 2 kg, fêmeas, hígdas, provenientes de criadouro qualificado. Camundongos SWISS fêmeas com peso entre 22-24 gramas provenientes do biotério UFPR também foram utilizados. Os animais permaneceram em quarentena no criadouro por no mínimo 14 dias e, após este período, foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 18°C e 22°C e com fornecimento de água e alimentação *ad libitum*.

3.5.1 Vacinação de coelhos e desafio com veneno: formulação vacinal 1 e 2

Coelhos receberam, via intramuscular, uma preparação 1:1 de um pool de antígenos e adjuvante. O *pool* de antígenos é preparado com massas iguais das FLDs loxoscélicas LirecDT1Y228A, LirecDT1H12/H47A e LirecDT1E32/D34A e o adjuvante escolhido foi hidróxido de alumínio 4% por ser o mais utilizado em vacinações humanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O esquema de imunização contou com três doses com intervalo de 30 dias entre cada aplicação. Os animais foram imunizados com doses crescentes do *pool* de antígenos. O esquema de imunização contou com três doses com intervalo de 30 dias entre cada aplicação. Duas formulações vacinais diferentes foram testadas com diferentes massas de FLDs. Formulação 1: 50 µg, 100 µg e 300 µg (n=2). Formulação 2: 100 µg, 150 µg e 400 µg (n=2). Posteriormente os animais vacinados foram desafiados com 10 µg (SILVEIRA, *et al.*, 2006) de cada veneno loxoscélico (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) em pontos diferentes na região dorso lateral. Coelhos controle negativo (n=3) receberam doses de PBS e adjuvante (1:1), no mesmo volume da preparação inoculada nos animais imunizados, seguindo o mesmo esquema de imunização. Para o desafio com veneno, cada animal controle recebeu a aplicação de 1 dos venenos loxoscélicos (10 µg) (SILVEIRA, *et al.*, 2006) na região dorso lateral. Uma solução salina estéril 0,85% (solvente do veneno) foi aplicada em todos os animais como controle negativo do teste (VUITIKA *et al.*, 2016). A área da aplicação foi fotografada nos tempos de: 0, 3, 6, 24 horas para acompanhamento da progressão da lesão.

3.5.2 Vacinação de coelhos e desafio com veneno: formulação vacinal 3

Coelhos receberam, via intramuscular, uma preparação 1:1 de um pool de antígenos e adjuvante seguindo o mesmo esquema de vacinação do ensaio piloto. Neste ensaio, foi testada uma terceira formulação vacinal com maiores massas de antígenos. Novamente, o esquema de imunização contou com três doses com intervalo de 30 dias entre cada aplicação. Formulação 3: 300 µg, 600 µg e 1 mg (n=9). Os animais vacinados foram divididos em grupos. Cada grupo foi desafiado com 10 µg (SILVEIRA, *et al.*, 2006) de 1 dos venenos loxoscélicos (*L. intermedia*, *L. laeta* ou *L. gaucho*) na região dorso lateral. Coelhos controle negativo (n=9) receberam doses de PBS e adjuvante (1:1), no mesmo volume da preparação inoculada nos animais imunizados, seguindo o mesmo esquema de imunização. Cada animal controle recebeu a aplicação de 1 dos venenos loxoscélicos (10 µg) na região dorso lateral. Uma solução salina estéril 0,85% (solvente do veneno) foi aplicada em todos os animais como controle negativo do teste (VUITIKA *et al.*, 2016). A área da aplicação foi fotografada e o edema foi medido nos tempos de: 0, 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas para acompanhamento da progressão da lesão.

3.5.3 Vacinação de coelhos: mensuração de edema (formulação 3)

Utilizando um paquímetro foram realizadas medidas do maior diâmetro horizontal e vertical das lesões provocadas pelo veneno loxoscélico nos tempos de: 0, 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas. Para converter as medidas de diâmetro em área, foi realizada uma média dos diâmetros horizontal e vertical, e esse diâmetro médio foi utilizado para calcular a área de um círculo ($A = \pi \cdot r^2$). A comparação da área do edema dos animais controle negativo e imunizados foi realizada no *software* GraphPad Prism 8.0.2 (San Diego, CA) através de análise de variância ANOVA e pós teste Sidak.

3.5.3 Vacinação de coelhos: análises hematológicas e bioquímicas (formulação 3)

A fim de verificar danos sistêmicos causados pelo veneno e para verificar possíveis danos causados pela vacinação foram realizadas análises laboratoriais de

índices hematológicos e bioquímicos do sangue dos animais vacinados e controle da terceira formulação vacinal.

A colheita de sangue deu-se a partir da Veia Auricular ou punção cardíaca imediatamente antes do desafio com veneno loxoscélico e 24 horas depois. Então, foram realizados hemograma completo (Eritograma e leucograma) e quantificações de parâmetros bioquímicos (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, creatinoquinase muscular – CK-M, gamaglutamiltransferase – GGT, creatinina sérica, ureia sérica, proteína sérica total, albumina sérica, globulina, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase - LDH, bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta). O Kit utilizado para a realização do hemograma foi o da marca Mindray (M-30 D, M-30CFL e M-30R) e para os parâmetros bioquímicos da Bioclin. Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. A análise estatística dos dados foi realizada no *software* GraphPad Prism 8.0.2 (San Diego, CA) através de análise de variância ANOVA e pós teste Sidak. A análise foi realizada entre os grupos avaliados (vacinados e controle) nos tempos de 0 e 24 horas e no mesmo grupo entre os tempos avaliados. Ainda, o sangue dos animais foi coletado antes da imunização (soro pré imune) e 15 dias após a terceira dose de vacina (soro hiperimune) para realização dos ensaios de *Western Blot* e ELISA.

1.4.6 Vacinação de coelhos: avaliação da imunogenicidade das formulações 1, 2 e 3 através de *Western Blot*.

Para testar a capacidade das formulações vacinais induzirem a produção de anticorpos que reconhecem o veneno loxoscélico foram realizadas corridas eletroforéticas (SDS-PAGE 10%) de 2,5 µg de veneno total de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. O protocolo foi seguido conforme descrito anteriormente em 3.4. Diluição dos anticorpos primários: 1:5.000. Foram testados os soros de todos os animais vacinados com as formulações 1 e 2 e de 3 animais selecionados aleatoriamente do grupo 3. Além disso, um pool de soros de animais controle negativo e pré imune foram avaliados.

1.4.7 Vacinação de coelhos: avaliação da imunogenicidade das formulações 1, 2 e 3 através de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Para verificar a produção de anticorpos (imunogenicidade) induzida pelas vacinas e, se esses são capazes de reconhecer as Fosfolipases D nativas do veneno de *Loxosceles* (antigenicidade) foi realizado um ensaio de ELISA. Neste ensaio, foram avaliados pool com partes iguais dos soros de todos os animais que receberam as formulações 1, 2 e 3. Além disso, um pool de soros animais controle negativo também foi avaliada.

Placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com uma solução com 10 µg/mL (100 µL por poço) do veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* ou *L. gaucho* em tampão de bicarbonato de sódio 0,02 M pH 9,6 overnight a 4°C. Após lavagem com solução de PBS Tween 20 0,05% os poços foram bloqueados com solução de PBS caseína 2% durante uma hora a 37°C. Em seguida, os poços foram novamente lavados e os soros obtidos nas vacinações adicionados na diluição de 1:40.000 e incubados durante uma hora a 37°C. Na sequência, as placas foram lavadas e incubadas durante 60 minutos a 37°C com anti-IgG coelho conjugada com peroxidase em uma diluição de 1:5000. Após nova lavagem as reações colorimétricas foram reveladas utilizando 0,4 mg/mL de OPD (orto-fenileno diamina), com 4 µL/mL H₂O₂, em tampão citrato para peroxidase pH 5,0 (50 mM de fosfato de sódio monobásico, 24 mM de ácido cítrico) durante 30 minutos e a reação foi parada com 50 µL de ácido sulfúrico 1 M. Valores de absorbância foram mensurados a 492 nm no leitor de ELISA (Meridiam ELX 800). A fim de descartar a possibilidade de reações inespecíficas por parte dos soros sanguíneos e comerciais, soros pré imunes foram utilizados. Todas as amostras foram realizadas em triplicata (adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

1.4.8 Vacinação de camundongos e desafio com veneno: ensaio de letalidade

Camundongos receberam, via intraperitoneal, uma preparação 1:1 de um pool de antígenos e adjuvante. O *pool* de antígenos é preparado com concentrações iguais das FLDs loxoscélicas LirecDT1Y228A, LirecDT1H12/H47A e LirecDT1E32/D34A e

o adjuvante escolhido foi hidróxido de alumínio 4% por ser o mais utilizado em vacinações humanas, como mencionado anteriormente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O esquema de imunização contou com três doses com intervalo de 3 semanas entre cada aplicação. Os animais foram imunizados (via intraperitoneal) com doses crescentes do *pool* de antígenos: 30 µg, 60 µg e 100 µg (n=24). Animais controle negativo (n=24) receberam doses de PBS e adjuvante (na proporção 1:1), no mesmo volume da preparação inoculada nos animais vacinados, seguindo o mesmo esquema de imunização. Os animais vacinados e controle foram desafiados com 10 µg do veneno de *L. intermedia* na região intraperitoneal. Os animais foram acompanhados e a letalidade foi avaliada nos tempos de: 24, 48, 72 horas.

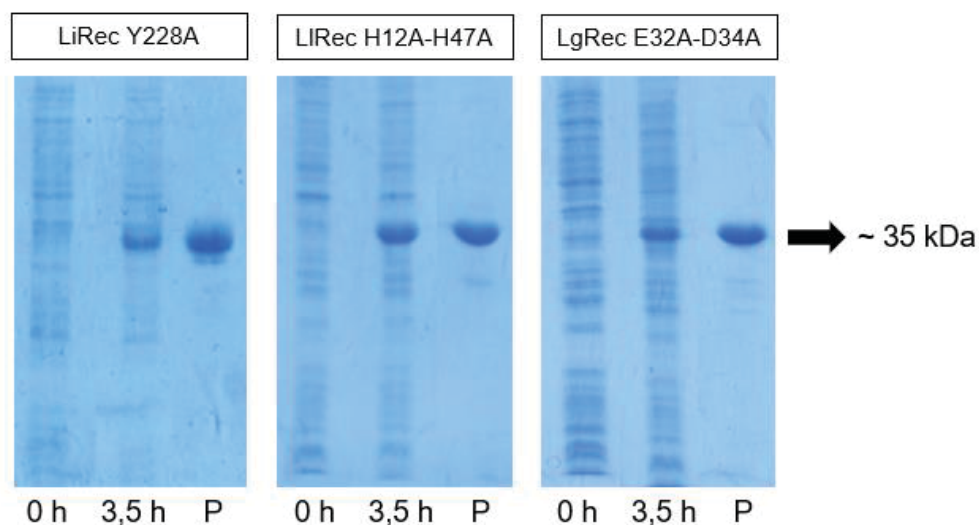
4 RESULTADOS

4.1 ANTÍGENOS: OBTENÇÃO, ATIVIDADE E RECONHECIMENTO.

Construções das FLDs em plasmídeo pET-14b usadas como antígenos (LiRecDT1Y228A, LiRecDT1H12A/H47A e LgRecDT1E32A/D34A) foram transformadas em cepa bacteriana de expressão BL21(DE3) pLysS. Após expressão, as proteínas foram purificadas pelo sistema de cromatografia ÄKTA pure em coluna cromatográfica de afinidade HisTrap™ HP. Para detectar a expressão dessas proteínas foram realizadas análises eletroforéticas do perfil proteico de amostras das bactérias antes da indução da expressão (0 horas) e após completado o tempo de expressão (3,5 horas). O perfil proteico das amostras purificadas (P) também foi avaliado.

As análises eletroforéticas em SDS-PAGE 12,5% das amostras coletadas em 0 horas e 3,5 horas após a indução da expressão revelaram o aparecimento de uma banda de aproximadamente 35 kDa (FIGURA 5). A mesma análise demonstrou que após o método de purificação apenas essa banda de 35 kDa estava presente (FIGURA 5).

FIGURA 5 – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES D COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS.

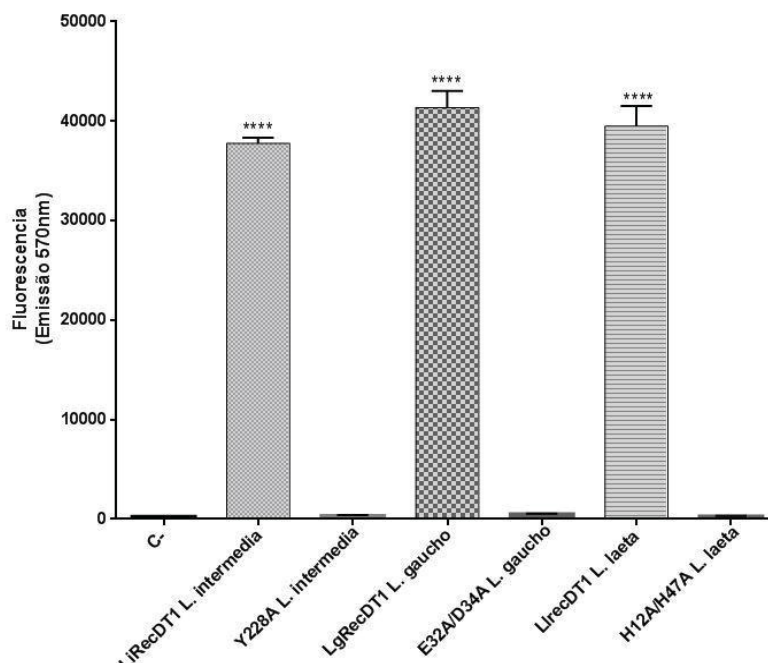


Análises SDS-PAGE (12,5% em condições redutoras) da expressão e purificação das fosfolipases D com mutações sítio dirigidas: LiRecY228A, LiRecH12A/H47A e LgRecE32A/D34A. As proteínas foram coradas com azul de *Coomassie*. 0h e 3,5h: Perfil proteico de amostras de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS coletadas por centrifugação após 0 e 3,5 horas de indução com 0,05 mM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido). P: Perfil proteico de uma amostra das toxinas purificadas com auxílio do sistema de cromatografia ÄKTA pure com coluna cromatográfica de afinidade HisTrap™ HP 1 mL pré empacotada com Ni Sepharose (G&E).

Duas abordagens diferentes foram aplicadas para testar a atividade dos antígenos usados na formulação vacinal. O primeiro teste denominado *Amplex Red*, que quantifica a atividade esfingomielinásica, demonstrou que as FLDs mutadas perderam a capacidade de hidrolisar esfingomielina mesmo em altas massas (100 μ g) (FIGURA 6).

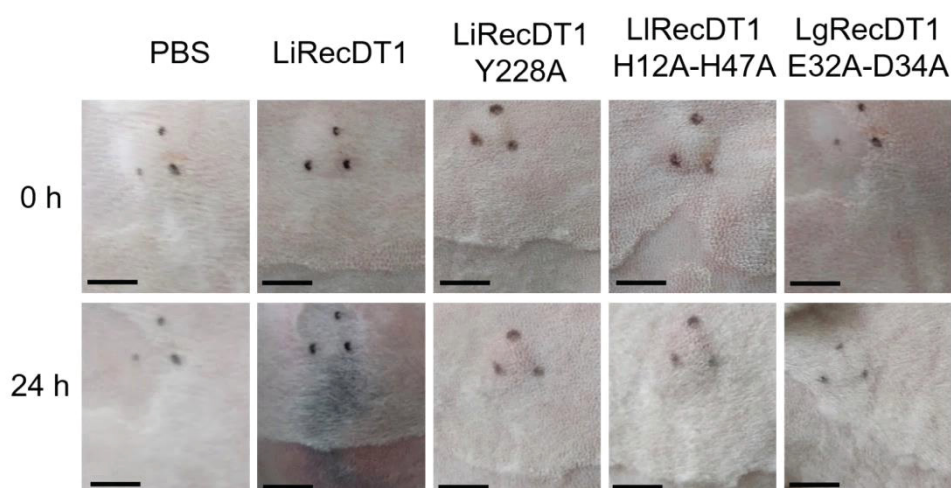
O ensaio *in vivo* ressaltou a eficiência das mutações sítio dirigidas. Esse ensaio, confirmou que a isoforma selvagem de FLD de *L. intermedia* (LiRecDT1) (10 μ g) é capaz de desenvolver lesões macroscópicas na pele de coelhos a partir de 3 horas de inoculação (FIGURA 7). Já as isoformas mutadas (LiRecDT1 Y228A, LiRecDT1 H12A-H47A e LgRecDT1 E32A-D34A) não apresentaram capacidade de induzir lesões macroscópicas em nenhum dos tempos avaliados, mesmo com uma alta massa de FLDs inoculada (50 μ g) (FIGURA 7).

FIGURA 6 – ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA (*Amplex Red*) DAS FOSFOLIPASES D SELVAGENS E COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS.



Atividade esfingomielinásica das isoformas selvagens de fosfolipases D (LiRecDT1, LgRecDT1, LiRecDT1) e suas respectivas isoformas com mutações sítio-dirigidas (LiRecDT1 Y228A, LgRecDT1 E32A-D34A e LiRecDT1 H12AH47A) (100 µg). O produto da reação foi fluorimetricamente quantificado em comprimentos de onda de 540 nm (excitação) e 570 nm (emissão). O controle negativo foi obtido por incubação da mistura de reagentes *Amplex Red* na ausência de proteínas. A média \pm desvio padrão é mostrada. A comparação foi feita entre as leituras de emissão dos grupos de toxinas selvagens e mutadas frente à leitura do controle negativo, ANOVA com pós teste Tuckey **** $p < 0,001$.

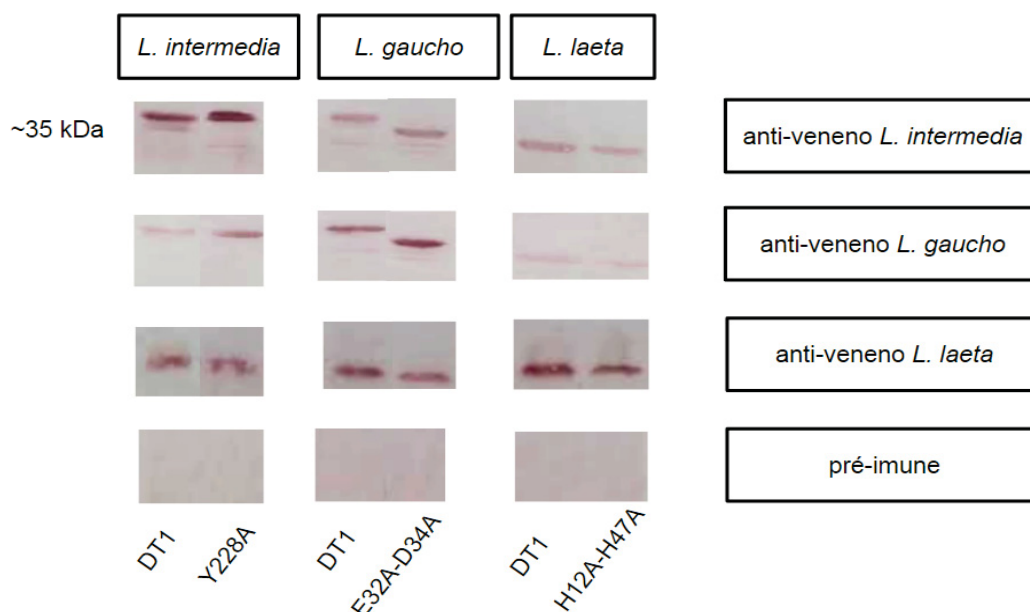
FIGURA 7 – ATIVIDADE DERMONECRÓTICA DAS FOSFOLIPASES D COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS.



Dermonecrose em coelhos. Análise macroscópica das lesões após aplicação intradérmica de 50 µg das isoformas mutadas recombinantes de fosfolipases-D (LiRecDT1H12A/H47A; LiRecDT1Y228A e LgRecDT1E32/D34A). Como controle positivo de dermonecrose foi aplicado 10 µg da isoforma selvagem LiRecDT1. PBS foi usado como controle negativo. As lesões foram acompanhadas e fotografadas nos tempos de 0 e 24 horas após a aplicação das toxinas. Apenas o ponto de aplicação de LiRecDT1 apresentou lesão dermonecrótica.

Após comprovar a inatividade *in vitro* e *in vivo* das FLDs mutadas recombinantes foi investigada a imunogenicidade destas proteínas. Por meio do ensaio de *Western Blot* foi revelado que as toxinas recombinantes mutadas foram reconhecidas por anticorpos contra o veneno total, na mesma intensidade que as toxinas recombinantes selvagens (Figura 8).

FIGURA 8– REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA (*Western Blot*) DE FOSFOLIPASES D RECOMBINANTES SELVAGENS E SUAS ISOFORMAS MUTADAS.



Western Blot. As proteínas purificadas (2,5 µg) selvagens (LiRecDT1, LgRecDT1 e LIRecDT1) e mutadas (LiRecDT1Y228A, LgRecDT1E32A/D34A e LIRecDT1H12A/H47A) foram separadas por SDS-PAGE sob condições redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose que foram expostas a anticorpos produzidos contra o veneno total de *L. intermedia*, *L. laeta* ou *L. gaucho* (1:1.000) ou anticorpos contra LiRecDT1 (1:1.000). Para a detecção de reações imunológicas foi utilizado anti-IgG secundário conjugado à fosfatase alcalina (1:5.000) e a reação foi revelada com BCIP/NBT. Como controle para especificidade de anticorpos foi usado o soro pré-imune dos animais produtores dos anticorpos.

4.2 FORMULAÇÕES VACINAIS 1 E 2

4.2.1 Lesões cutâneas

Por apresentarem inatividade e imunogenicidade, as FLDs foram elencadas como antígenos para uma vacina capaz de proteger coelhos frente a um dos danos causados pelo veneno de *Loxosceles*: o loxoscelismo cutâneo. A fim de avaliar as massas usadas na formulação vacinal, um ensaio piloto foi realizado com coelhos (n = 7) esses animais foram divididos em 3 grupos: Controle negativo, vacinados grupo

1 e vacinados grupo 2. Os animais vacinados do grupo 1 receberam até 300 µg dos antígenos e os do grupo 2 até 400 µg.

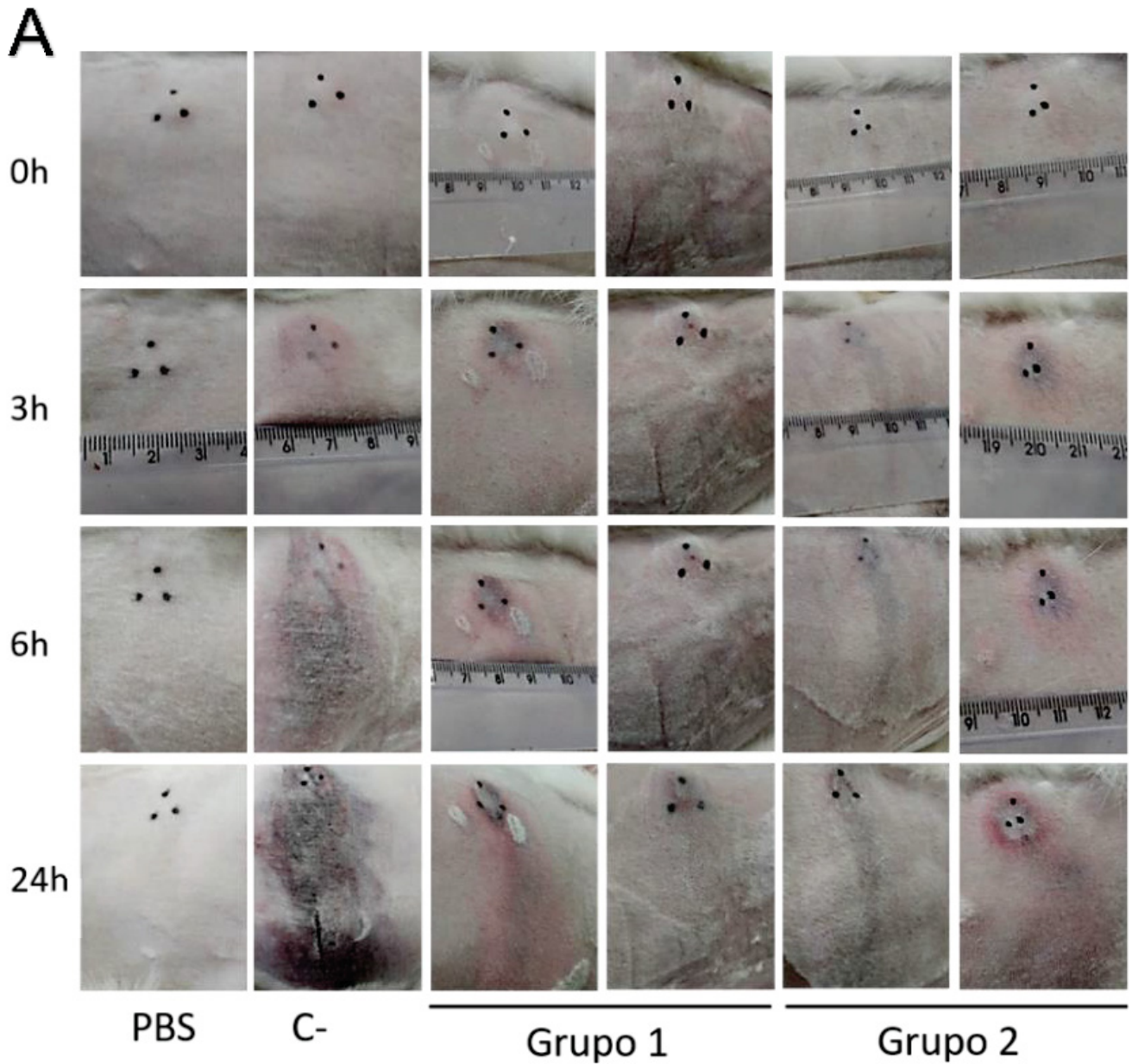
Os animais dos grupos controle negativo e vacinados foram desafiados com o veneno total de *L. intermedia* (FIGURA 9A), *L. laeta* (FIGURA 9B) e *L. gaucho* (FIGURA 9C) 15 dias após o término da vacinação. Sendo que os animais do grupo controle negativo (n=3) receberam a aplicação de apenas um dos venenos loxoscélicos. Já os animais vacinados (n=4) receberam os 3 venenos em diferentes pontos de aplicação.

A lesão cutânea no grupo controle negativo iniciou-se em todos os animais testados em 3 horas após a injeção do veneno de *Loxosceles*. Macroscopicamente, nesse intervalo é possível observar edema, eritema e equimose no local da aplicação (FIGURA 9). A lesão espalhou-se de forma gravitacional sendo acompanhada por necrose dérmica no tempo de 24 horas (FIGURA 9).

Os animais vacinados apresentaram uma significativa diminuição das lesões macroscópicas em resposta a todos os venenos de *Loxosceles* em todos os intervalos avaliados quando comparados com os animais controle negativo (FIGURA 9). As lesões cutâneas também iniciaram após 3 horas da inoculação do veneno sendo possível observar macroscopicamente edema, eritema e equimose na maioria dos animais avaliados. Porém, quando as lesões são comparadas com os animais controle negativo, além de uma menor área de lesão, os animais vacinados apresentaram menos edema, eritema, equimose, área necrótica e espalhamento gravitacional desde o primeiro tempo avaliado (FIGURA 9).

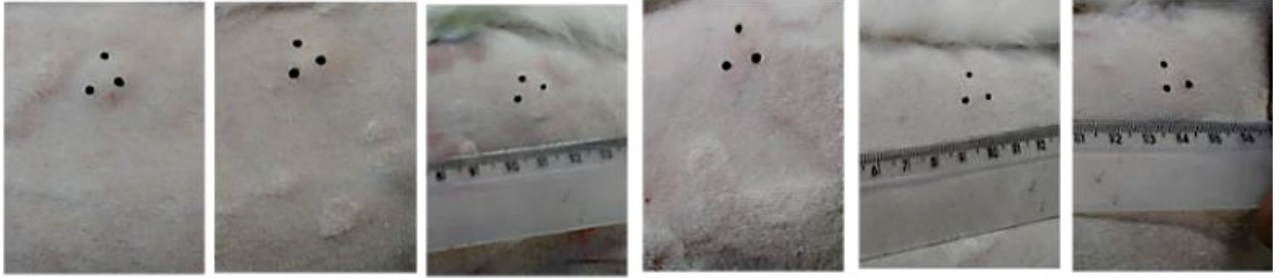
Foi possível verificar que a menor proteção foi em resposta ao veneno de *L. intermedia* (FIGURA 9A) e que, visualmente, não houve uma diferença significativa nas lesões macroscópicas entre os grupos 1 e 2 para nenhum dos venenos inoculados (FIGURA 9).

FIGURA 9 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES DERMONECRÓTICAS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* (A), *L. laeta* (B) e *L. gaucho* (C) NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS (GRUPO 1 E 2).

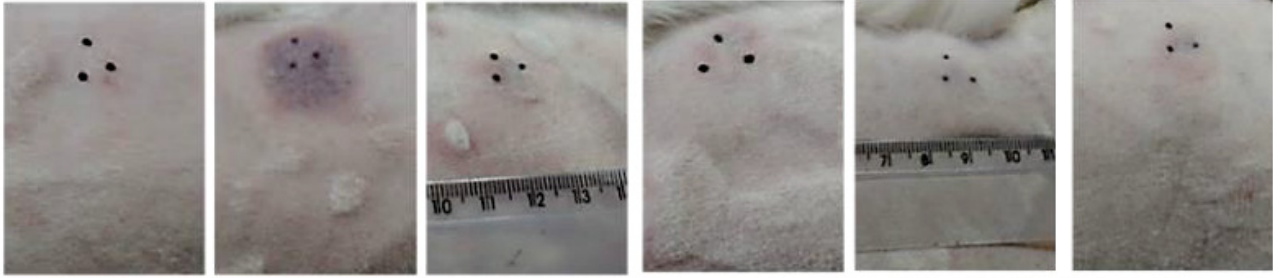


B

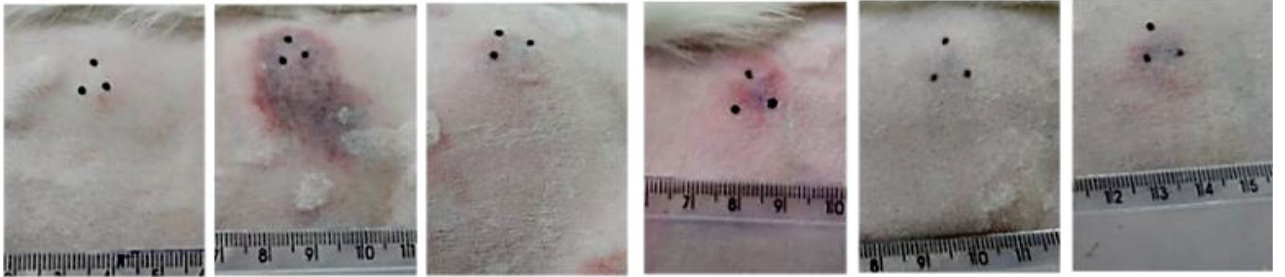
0h



3h



6h



24h

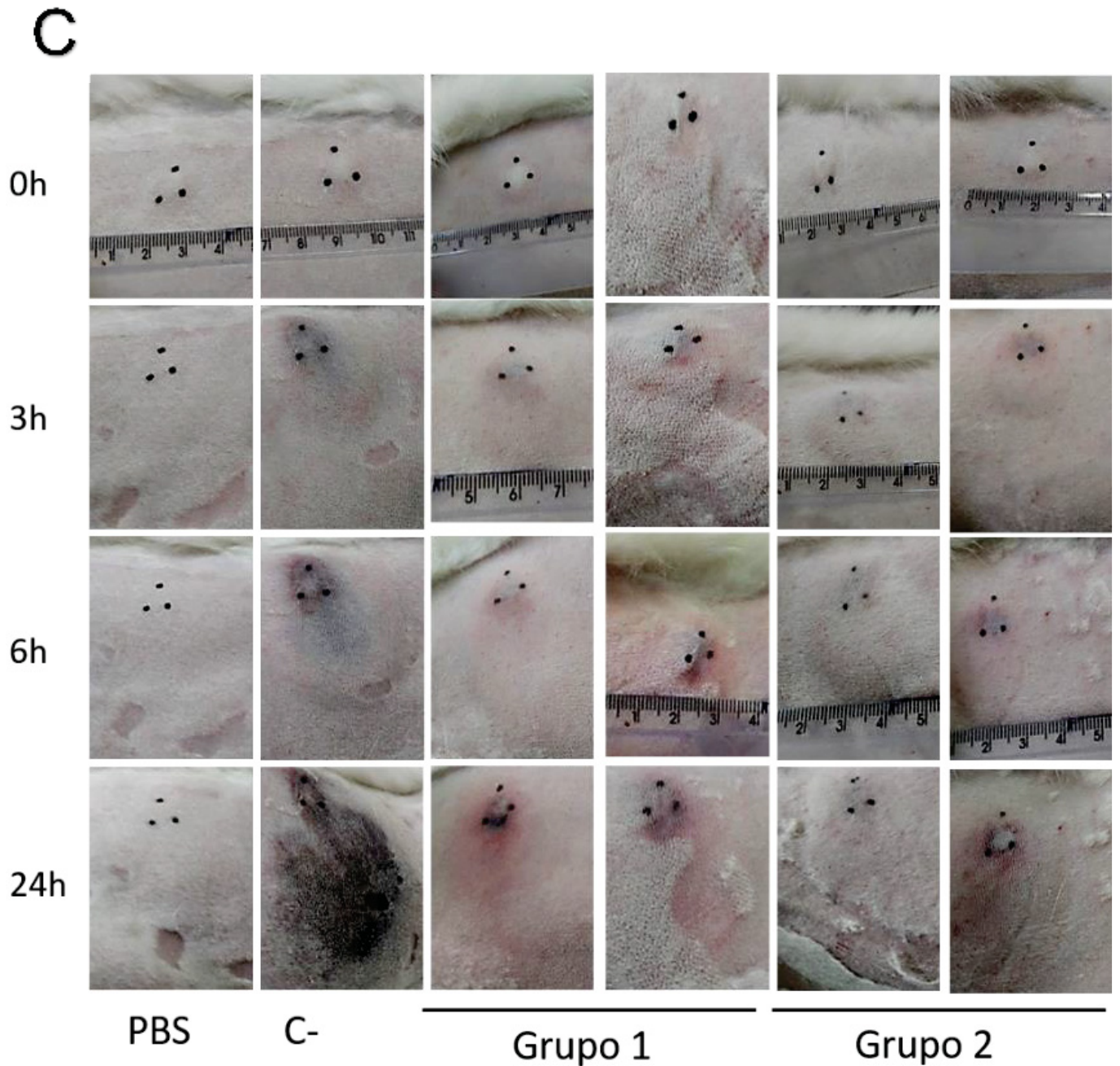


PBS

C-

Grupo 1

Grupo 2



Análise macroscópica das lesões dermonecroticas em coelhos vacinados (grupo 1 com a formulação 1 e grupo 2 com a formulação 2) e coelhos não vacinados (C-) 24 horas após a aplicação do veneno de *Loxosceles sp.* **A)** Aplicação do veneno total de *Loxosceles intermedia* (10 µg) ou PBS. **B)** Aplicação do veneno de *Loxosceles laeta* (10 µg) ou PBS. **C)** Aplicação do veneno de *Loxosceles gaucho* (10 µg) ou PBS. Esse ensaio foi realizado 15 dias após o término do esquema de vacinação. C-: animais que receberam apenas PBS e adjuvante como vacina. Grupo 1 e 2: animais que receberam as formulações vacinais 1 e 2, respectivamente.

4.3 FORMULAÇÃO VACINAL 3

4.3.1. Lesões cutâneas

Após ensaio piloto de vacinação (formulações 1 e 2) optou-se por testar uma nova formulação vacinal com maior massa de antígeno, nesse ensaio os animais vacinados receberam até 1 mg do pool das FLDs mutadas recombinantes. Além disso, para realização de ensaios bioquímicos e hematimétricos, cada animal, após o término do esquema de vacinação, foi desafiado com apenas 1 dos venenos loxoscélicos. Os animais foram acompanhados por mais tempo para melhor avaliação da progressão das lesões.

As lesões cutâneas no grupo controle negativo iniciaram-se em todos os animais testados e para todos os venenos loxoscélicos em 3 horas após inoculação. Macroscopicamente, nesse tempo é possível observar edema, eritema e equimose no local da aplicação (FIGURA 10). A lesão espalhou-se de forma gravitacional sendo acompanhada por necrose dérmica a partir de 24 horas após inoculação (FIGURA 10). Em 96 horas a maioria dos animais controle negativo apresentaram crosta necrótica (FIGURA 10).

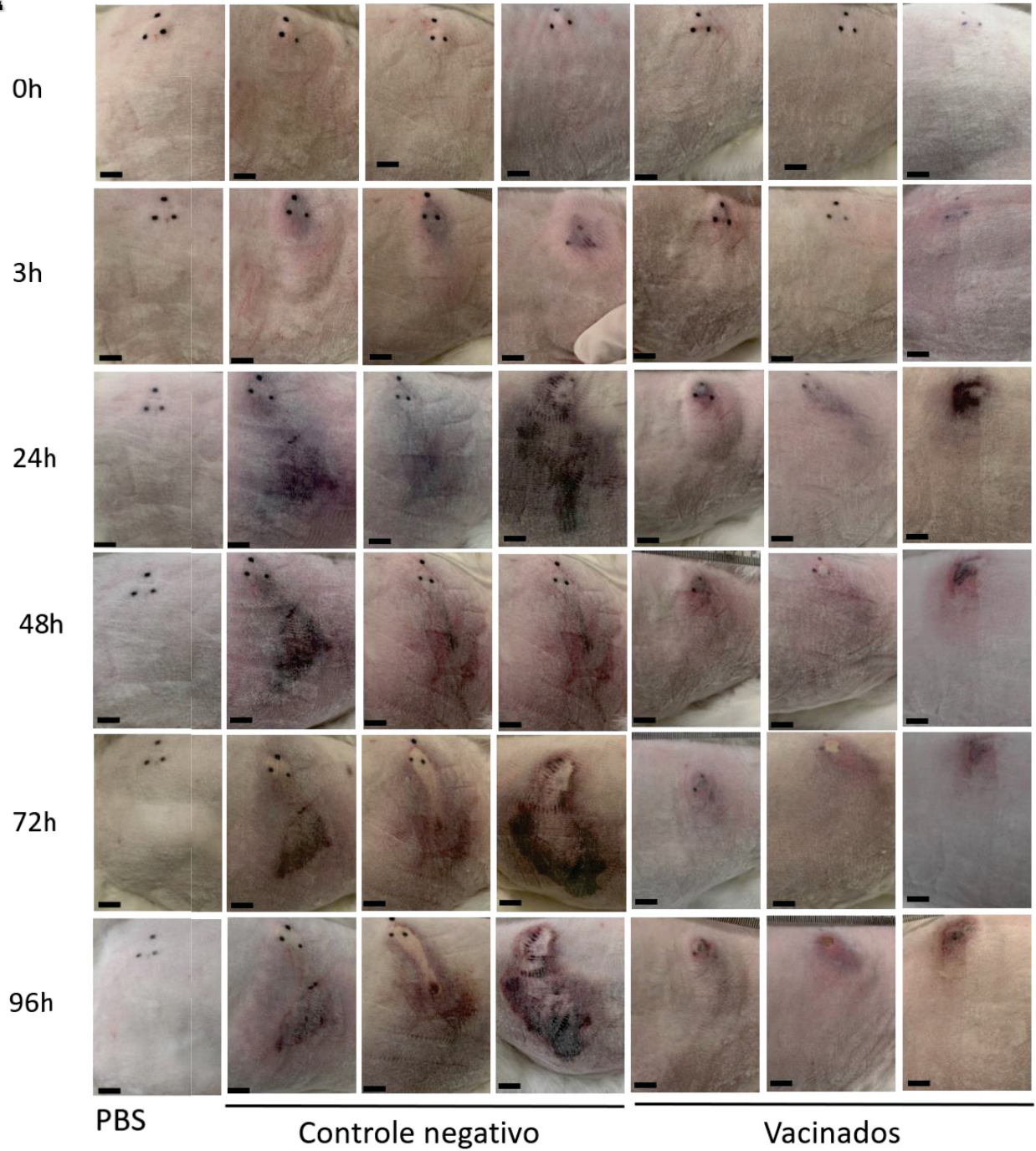
Na maioria dos animais vacinados as lesões macroscópicas também tiveram início em 3 horas após inoculação do veneno, sendo as lesões cutâneas deste tempo quase imperceptíveis na maioria dos animais (FIGURA 10). Macroscopicamente, foi possível observar edema, eritema e equimose em alguns animais sendo que esses sinais não estavam presentes em todos os animais após 3 horas da inoculação (FIGURA 10).

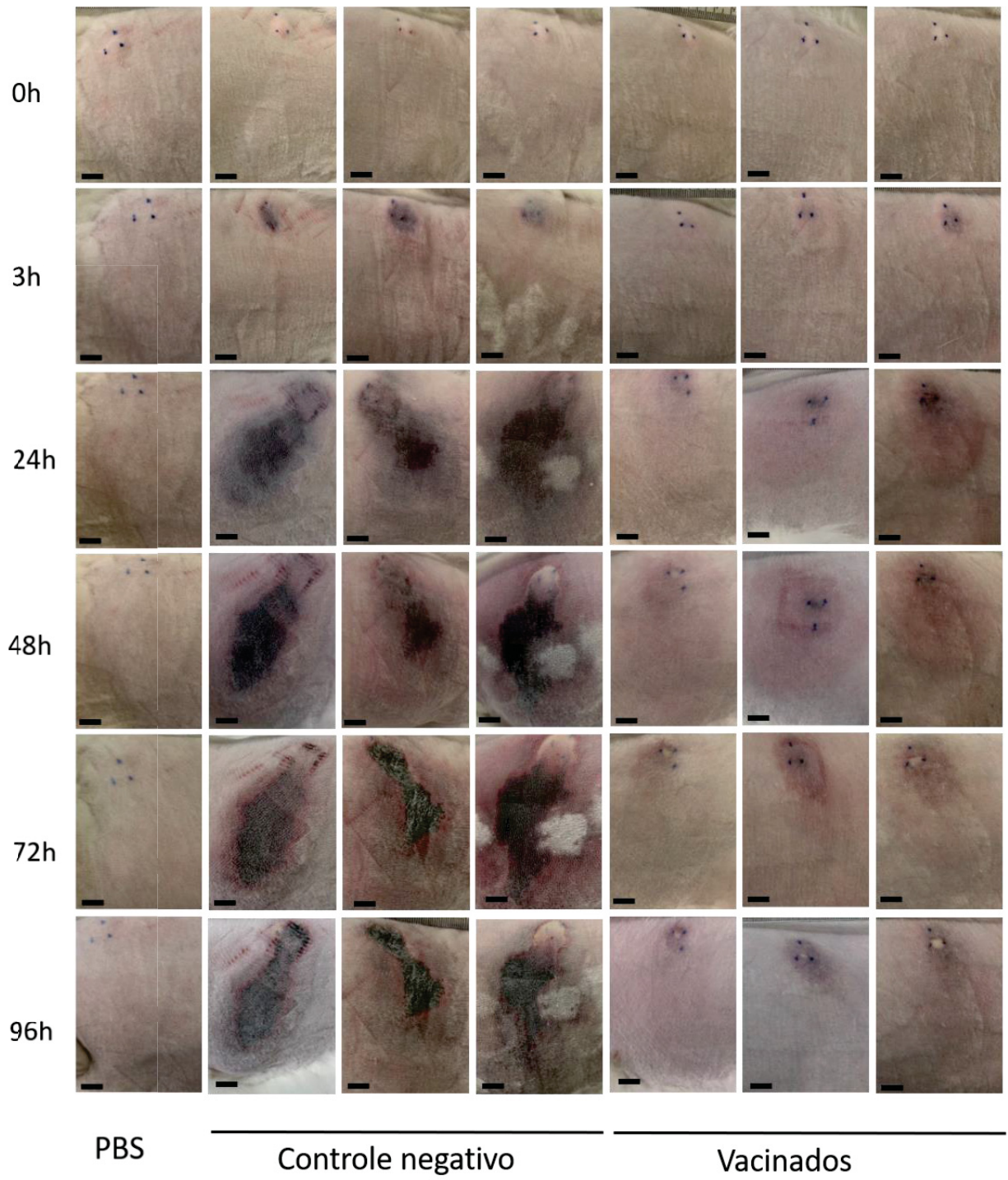
A progressão da lesão cutânea dos animais vacinados ocorreu de forma mais branda do que nos animais controle negativo. Foi observada uma área de lesão muito menor, com menos edema, eritema, equimose e espalhamento gravitacional nos tempos de 24, 48 e 72 horas (FIGURA 10). Apenas alguns animais apresentaram formação de lesão dermonecrotica visual nos tempos avaliados (FIGURA 10).

A vacinação foi eficiente na redução do loxoscelismo cutâneo causado pelos venenos de *L. intermedia* (FIGURA 10A), *L. laeta* (FIGURA 10B) e *L. gaucho* (FIGURA 10C) quando comparados os animais do grupo controle negativo e vacinados. A menor proteção foi observada em resposta ao veneno de *L. intermedia* (FIGURA 10A).

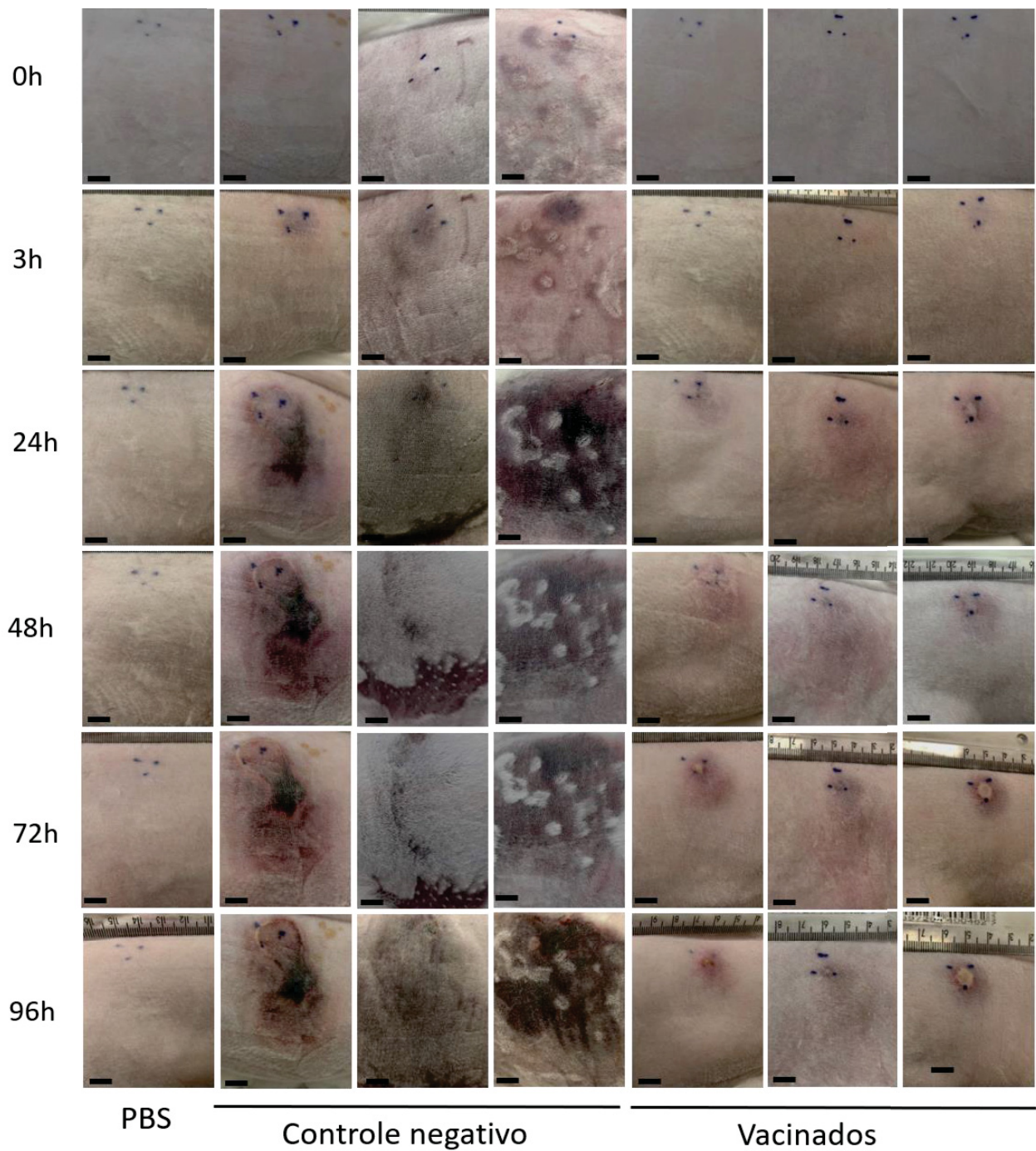
FIGURA 10– AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES DERMONECRÓTICAS APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* (A), *L. laeta* (B) e *L. gaucho* (C) NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.

A



B

C

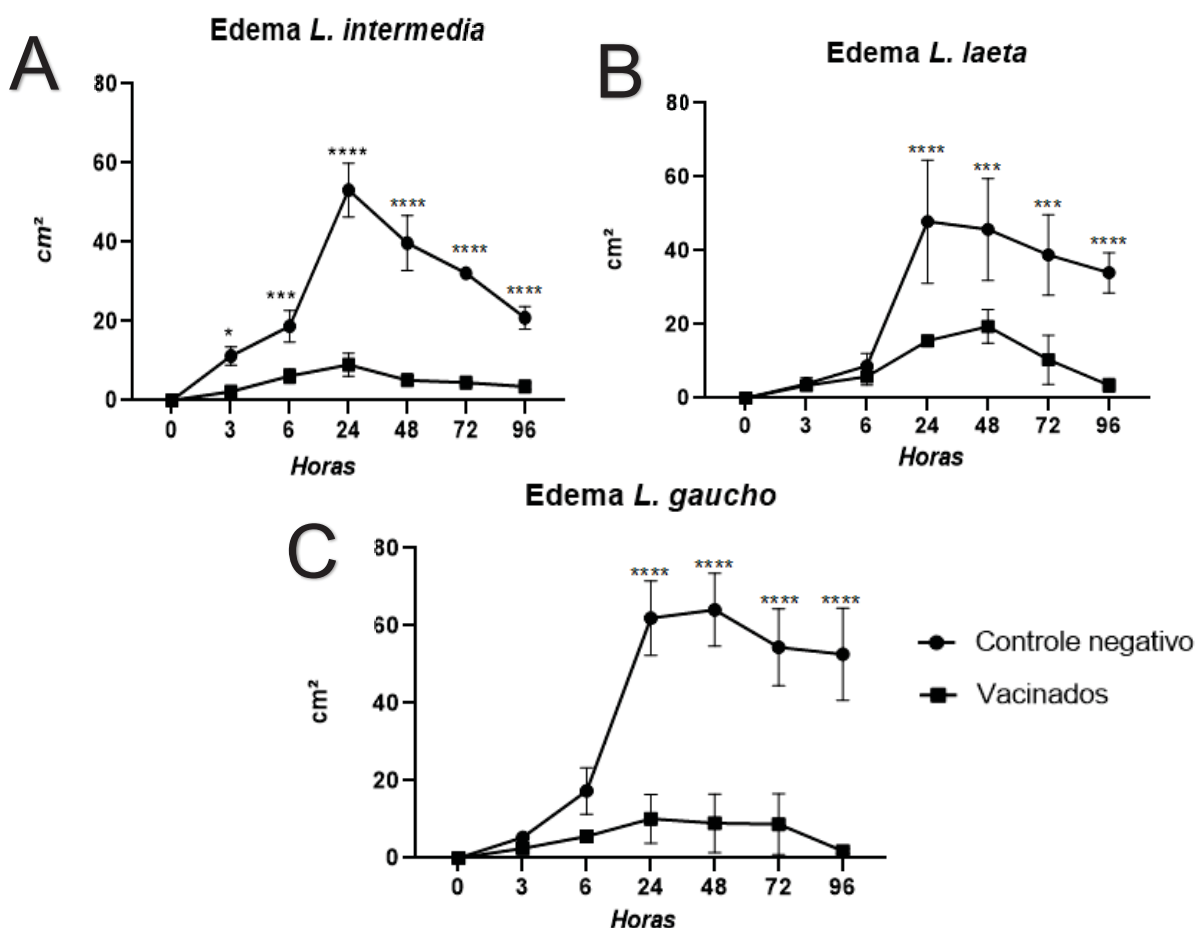


Análise macroscópica das lesões dermonecroticas em coelhos vacinados (com a formulação 3) e coelhos controle negativos (C-) após a aplicação do veneno de *Loxosceles* sp. **A)** Aplicação do veneno total de *Loxosceles intermedia* (10 µg) ou PBS. **B)** Aplicação do veneno de *Loxosceles laeta* (10 µg) ou PBS. **C)** Aplicação do veneno de *Loxosceles gaucho* (10 µg) ou PBS. Esse ensaio foi realizado 15 dias após o término do esquema de vacinação. As lesões foram acompanhadas, fotografadas e o edema mensurado nos tempos de 0, 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas. C-: animais que receberam apenas PBS e adjuvante como vacina. Vacinados: animais que receberam até 1mg de FLDs na formulação vacinal.

4.3.2 Edema

O edema dos animais dos grupos vacinados e controle negativo foi mensurado e convertido em área. Foi possível observar redução significativa na área de edema nos animais imunizados, em todos os tempos avaliados após a inoculação do veneno de *L. intermedia*, quando comparados aos animais controle negativo (FIGURA 7 A). Já para os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* a redução do edema começou a ser significativa 24 horas pós inoculação (FIGURA 7 B e C).

FIGURA 11 – AVALIAÇÃO CINÉTICA DO EDEMA APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* (A) *L. laeta* (B) e *L. gaucho* (C) NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.



Área de edema média ($n = 3$) \pm SD medido nos tempos 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação ID de veneno (10 μ g) de *L. intermedia* (A), *L. laeta* (B) e *L. gaucho* (C) nos grupos de coelhos controle negativo e vacinados. A aplicação de salina (ID no dorso) foi avaliada apresentando ausência de edema nos mesmos tempos avaliados (não mostrado). Houve redução significativa do edema em todos os tempos avaliados para *L. intermedia* e a partir de 24 horas para *L. laeta* e *L. gaucho*. ANOVA com pós teste Sidak **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,1$. ID= intradérmica.

O pico máximo da área média de edema foi observado em 24 horas para os grupos desafiados com o veneno de *L. intermedia* tanto nos animais controle negativo (53,17 cm²) quanto nos animais vacinados (9,06 cm²). A área de edema teve sua maior redução quando comparados os dois grupos no tempo de 48 horas. Neste tempo os animais vacinados apresentaram área de edema 87,23% menor que os do grupo controle negativo (TABELA 2).

TABELA 2 - VALORES MÉDIOS DE EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E IMUNIZADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*.

Tempos	Edema (cm ²)		
	Controle	Vacinados	Redução (%)
3 h	11,23 ± 1,78	2,23 ± 0,15	80,16
6 h	18,75 ± 2,82	6,17 ± 1,25	67,10
24 h	53,17 ± 5,10	9,06 ± 1,94	82,96
48 h	38,80 ± 4,75	5,08 ± 0,87	87,23
72 h	32,17 ± 0,67	4,49 ± 0,68	86,03
96 h	20,90 ± 2,12	3,50 ± 0,64	83,26

NOTA: n=3; valores em negrito: pico máximo e redução máxima de edema

Para o veneno de *L. laeta* o pico máximo da área média de edema foi observado em 24 horas para os animais controle negativo (47,87 cm²) e 48 horas nos animais vacinados (19,44 cm²) e a redução máxima de edema ocorreu em 96 horas com área 89,70% menor nos animais vacinados (TABELA 3).

TABELA 3 - VALORES MÉDIOS DE EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E IMUNIZADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. laeta*.

Tempos	Edema (cm ²)		
	Controle	Vacinados	Redução (%)
3 h	3,92 ± 1,19	3,42 ± 0,77	12,85
6 h	8,77 ± 2,53	5,82 ± 1,57	33,66
24 h	47,87 ± 12,75	15,57 ± 0,92	67,48
48 h	45,73 ± 10,36	19,44 ± 3,50	57,50
72 h	38,83 ± 7,35	10,41 ± 5,05	73,18
96 h	34,02 ± 4,14	3,50 ± 1,38	89,70

NOTA: n=3; valores em negrito: pico máximo e redução máxima de edema.

A inoculação do veneno de *L. gauch*o provocou pico máximo da área média de edema em 48 horas para os animais controle negativo (64,08 cm²) e 24 horas nos animais vacinados (10,14 cm²) e a redução máxima de edema ocorreu em 96 horas com 96,57% de redução comparando os dois grupos (TABELA 4).

TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DE EDEMA OBSERVADOS NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E IMUNIZADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. gauch*o.

Tempos	Edema (cm ²)		
	Controle	Vacinados	Redução (%)
3 h	5,36 ± 0,92	2,51 ± 0,34	53,08
6 h	17,34 ± 4,0	5,66 ± 1,12	67,35
24 h	61,99 ± 6,93	10,14 ± 4,81	83,65
48 h	64,08 ± 7,06	9,0 ± 5,81	85,95
72 h	54,43 ± 7,61	8,76 ± 5,97	83,90
96 h	52,65 ± 9,07	1,81 ± 0,49	96,57

NOTA: n=3; valores em negrito: pico máximo e redução máxima de edema.

4.3.3 Parâmetros sistêmicos

Para avaliar possíveis danos sistêmicos causados pelos venenos loxoscélicos e detectar se os animais vacinados estavam protegidos frente a esses danos, foram realizadas análises do hemograma (eritograma e leucograma) e dos índices bioquímicos. Apenas resultados de parâmetros alterados ou de importância para a discussão serão mostrados.

No hemograma também foram mensurados: Volume globular médio – VMG, concentração de hemoglobina globular média – CHGM, anisocitose, policromatófilos, metarrubrócitos, bastonetes, metaminelínócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos. Nenhum desses parâmetros encontrava-se fora dos valores de referência em nenhum dos tempos avaliados em nenhum animal. Além disso, não foi possível realizar a estimativa de plaquetas pela grande quantidade de amostras com plaquetas agregadas.

Quanto aos índices bioquímicos, além dos que serão mostrados, também foram dosados: albumina, globulina, fosfatase alcalina, lactato, bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta. Nenhum desses parâmetros encontrava-se fora dos valores de referência em nenhum dos tempos avaliados em nenhum animal. A tabela 5 resume os valores de referência para coelhos dos parâmetros elencados para discussão neste trabalho.

TABELA 5- VALORES DE REFERÊNCIA DE ERITOGrama, LEUCOGrama E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA COELHOS.

Eritograma e Leucograma		Parâmetros bioquímicos	
Eritrócitos totais	4-8	ALT	14-80
Hematócrito	30-50	AST	14-113
Hemoglobina	8-17.5	GGT	1.0-11.9
Leucócitos totais	5-12	LDH	34-150
Heterófilos absoluto	1.75-6.6	Proteína Total	5.4-7.5
Heterófilos relativo	35-55	Ureia	15-50
Linfócitos absoluto	3.0-7.2	Creatinina	0.5-2.6
Linfócitos relativo	25-60	CK-Muscular	252.0-3382.7

NOTA: Eritrócitos totais, leucócitos totais, heterófilos absoluto e leucócitos absoluto: milhões/ μ L; Hematócrito, heterófilos relativo e linfócitos relativo: %; Hemoglobina: g/dL; ALT, AST, GGT e CK-Muscular: U/L; Proteína total: g/dL, Ureia: mg/dL, Creatinina: mg/dL,. Fonte: Adaptado de CARPENTER & MARION (2018) e KORN e colaboradores (2018).

A contagem de células vermelhas e brancas do sangue antes e após a inoculação do veneno de *L. intermedia* revelou que apenas a porcentagem de heterófilos (contagem relativa) ficou acima dos valores de referência para a espécie. A proporção dessas células na linhagem branca estava alterada nos animais vacinados logo antes do desafio com o veneno e nos animais do grupo controle após 24 horas da inoculação com o veneno (TABELA 6). Não foram constatadas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros, nem entre os grupos e nem entre tempos avaliados.

TABELA 6- CONTAGEM DE ERITOGrama E LEUCOGrama ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO DO VENENO DE *L. intermedia* EM ANIMAIS VACINADOS E CONTROLE NEGATIVO

	0 horas		24 horas	
	Controle	Vacinados	Controle	Vacinados
Eritrócitos	6.4 ± 0.2	6.9 ± 0.3	5.6 ± 0.2	6.15 ± 0.6
Hematócrito	39.5 ± 1.5	41.33 ± 0.9	35.5 ± 0.5	38.33 ± 1.9
Hemoglobina	12.25 ± 0.4	11.1 ± 0.2	12.7 ± 0.6	11.4 ± 1.2
Leucócitos total	8.7 ± 0.7	7.85 ± 0.5	6.45 ± 0.65	9.25 ± 0.5
Heterófilos absoluto	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4	3.9 ± 0.8	4.8 ± 0.4
Heterófilos relativo	51.5 ± 0.5	57.5 ± 5.5	61.0 ± 0.6	52.0 ± 5.0
Linfócitos absoluto	3.6 ± 0.3	2.7 ± 0.4	1.7 ± 0.1	3.9 ± 0.8
Linfócitos relativo	42.0 ± 0.0	35.0 ± 6.0	27.0 ± 1	43.0 ± 8.0

NOTA: n= 3. Eritrócitos totais, leucócitos totais, heterófilos absoluto e leucócitos absoluto: milhões/ μ L; Hematócrito, heterófilos relativo e linfócitos relativo: %; Hemoglobina: g/dL. Valores em vermelho: acima da referência para a espécie (TABELA 5). Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados nem entre os grupos nem entre os tempos avaliados para o mesmo grupo. ANOVA com pós teste Sidak.

A avaliação bioquímica do soro dos animais controle negativo desafiados com o veneno de *L. intermedia* revelou valores médios das enzimas hepáticas ALT (alanina aminotransferase), GGT (gama glutamil transferase) e LDH (lactato desidrogenase) fora dos valores de referência para a espécie (aumentados) em 0 e 24 horas (TABELA 7). Foram observadas diferenças significativas em ALT e CK muscular no tempo de 24 horas entre os grupos controle e vacinados e em creatinina no grupo controle negativo entre os tempos avaliados. Diferenças significativas também foram observadas em creatinina e CK muscular entre os tempos avaliados para o grupo controle e vacinados, respectivamente.

TABELA 7– AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia* NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.

	0 horas		24 horas	
	Controle	Vacinados	Controle	Vacinados
ALT	82.0 ± 3.7	66.3 ± 3.5	95.9 ± 6.2*	67.6 ± 5.3*
AST	50.2 ± 21.4	35.9 ± 0.4	97.9 ± 25.9	40.8 ± 0.7
GGT	13.8 ± 1.5	8.63 ± 0.7	25.7 ± 14.9	12.1 ± 1.8
LDH	458.9 ± 89.4	343.6 ± 3.8	431.1 ± 180.6	628.1 ± 127.6
Proteína total	5.9 ± 0.06	6.5 ± 0.3	6.2 ± 0.6	5.9 ± 0.3
Ureia	44.1 ± 0.6	42.6 ± 2.9	49.9 ± 5.8	41 ± 1.2
Creatinina	1.0 ± 0.06*	0.93 ± 0.03	1.8 ± 0.3*	1.4 ± 0.1
CK-Muscular	1.347 ± 263.9	1.875 ± 41.0**	2.393 ± 468.9**	9.562 ± 2.101**

NOTA: n=3. ALT, AST, GGT e CK-Muscular: U/L; Proteína total: g/dL, Ureia: mg/dL, Creatinina: mg/dL.

Valores em vermelho: acima da referência para a espécie (TABELA 5). Diferenças significativas foram encontradas em ALT e CK-muscular em 24 horas entre os grupos controle e vacinados, em creatinina no grupo controle entre os tempos avaliados e em CK-muscular nos animais vacinados entre os tempos avaliados e em 24 horas entre os animais dos grupos controle e vacinados. ANOVA com pós teste Sidak, * p < 0,1, ** p < 0,01.

Antes e após a exposição ao veneno de *L. laeta* animais controle negativo e vacinados também tiveram seus parâmetros hematológicos avaliados. Os valores absolutos de linfócitos encontravam-se ligeiramente abaixo dos valores de referência para a espécie em ambos os grupos em 0 horas e no grupo controle em 24 horas (TABELA 8). Uma diferença significativa foi observada na concentração de hemoglobina dos animais do grupo controle entre os tempos avaliados (houve diminuição após 24 horas do desafio com o veneno).

TABELA 8- AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. laeta* NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.

	0 horas		24 horas	
	Controle	Vacinados	Controle	Vacinados
Eritrócitos	7.2 ± 0.4	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.3	6.4 ± 0.1
Hematócrito	43 ± 1.7	40 ± 1.0	39.3 ± 1.3	39 ± 1.5
Hemoglobina	13.6 ± 0.5*	12.5 ± 0.3	11.8 ± 0.1*	11.8 ± 0.2
Leucócitos totais	6.3 ± 0.4	7.9 ± 0.9	6.0 ± 0.8	8.8 ± 0.3
Heterófilos absoluto	2.8 ± 0.4	4.3 ± 1.3	2.9 ± 0.9	3.9 ± 0.4
Heterófilos relativo	44.7 ± 4.4	52.7 ± 9.9	46.7 ± 11.4	43.7 ± 3.3
Linfócitos absoluto	2.9 ± 0.4	2.9 ± 0.5	2.8 ± 0.7	4.8 ± 0.2
Linfócitos relativo	46.7 ± 6.1	38.7 ± 9.3	48.3 ± 13.7	54.3 ± 3.4

NOTA: n= 3. Eritrócitos totais, leucócitos totais, heterófilos absoluto e leucócitos absoluto: milhões/ μ L; Hematócrito, heterófilos relativo e linfócitos relativo: %; Hemoglobina: g/dL. Valores em vermelho: abaixo da referência para a espécie (TABELA 5). Uma redução significativa foi encontrada na concentração de hemoglobina no grupo controle negativo antes (0 horas) e após (24 horas) da inoculação do veneno de *L. laeta*. ANOVA com pós teste Sidak, * p < 0,1.

A avaliação bioquímica do soro dos mesmos animais revelou valores médios acima dos valores de referência para a espécie para as enzimas GGT e LDH em 0 e 24 horas após o desafio com o veneno em ambos os grupos (TABELA 9). Valores acima da referência também foram observados em CK-muscular 24 horas após o desafio com o veneno de *L. laeta* em ambos os grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados.

TABELA 9- AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. laeta* NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.

	0 horas		24 horas	
	Controle	Vacinados	Controle	Vacinados
ALT	56.5 ± 2.9	67.1 ± 15.3	66.9 ± 12.6	79.9 ± 9.3
AST	50.3 ± 11.3	47.7 ± 1.18	74.0 ± 5.3	53.4 ± 12.4
GGT	14.5 ± 0.3	14.2 ± 1.6	12.0 ± 0.5	12.3 ± 0.8
LDH	670.4 ± 99.2	709.4 ± 128.3	435.3 ± 52.1	531.9 ± 70.3
Proteína total	6.0 ± 0.3	5.9 ± 0.07	5.4 ± 0.2	5.6 ± 0.1
Ureia	41.0 ± 1.7	41.5 ± 5.1	47.4 ± 6.2	40.7 ± 4.4
Creatinina	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.09	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.07
CK-Muscular	1.715 ± 121.0	1.501 ± 318.8	3.418 ± 659.6	4.777 ± 1.181

NOTA: n=3. ALT, AST, GGT e CK-Muscular: U/L; Proteína total: g/dL, Ureia: mg/dL, Creatinina: mg/dL. Valores em vermelho: acima da referência para a espécie (TABELA 5). Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados. ANOVA com pós teste Sidak.

Não foi possível avaliar os índices hematimétricos dos animais desafiados com o veneno de *L. gaucho* porque as amostras de sangue estavam hemolisadas. Mas a avaliação dos parâmetros bioquímicos ainda foi possível. A avaliação bioquímica do soro dos animais dos grupos controle negativo e vacinados desafiados com o veneno de *L. gaucho* revelou que a média dos valores dos parâmetros ALT e AST estavam alteradas para cima nos dois grupos, sendo que a alteração em AST já estava presente nos animais controle em 0 horas (TABELA 10). Alterações acima da referência em LDH foram observadas para ambos os grupos nos dois tempos avaliados. A CK muscular também estava alterada para cima em ambos os grupos, exceto para os animais vacinados em 0 horas (TABELA 10). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros avaliados.

TABELA 10– AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. gaucho* NOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E VACINADOS.

	0 horas		24 horas	
	Controle	Vacinados	Controle	Vacinados
ALT	65.1 ± 11.2	79.3 ± 33.2	113.9 ± 23.1	104.8 ± 19.8
AST	122.5 ± 66.9	110.6 ± 47.1	222.0 ± 88.6	212.7 ± 77.3
GGT	10.7 ± 1.0	11.6 ± 1.6	10.7 ± 1.1	10.4 ± 1.5
LDH	889.0 ± 261.7	701.6 ± 101.6	429.9 ± 44.6	1.051 ± 325.9
Proteína total	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.2
Ureia	40.2 ± 1.0	38.6 ± 2.1	45.7 ± 16.0	59.0 ± 7.8
Creatinina	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.06	2.4 ± 1.3	1.2 ± 0.1
CK-Muscular	4.799 ± 1.313	2.488 ± 724.7	8.938 ± 1.907	11.831 ± 3.102

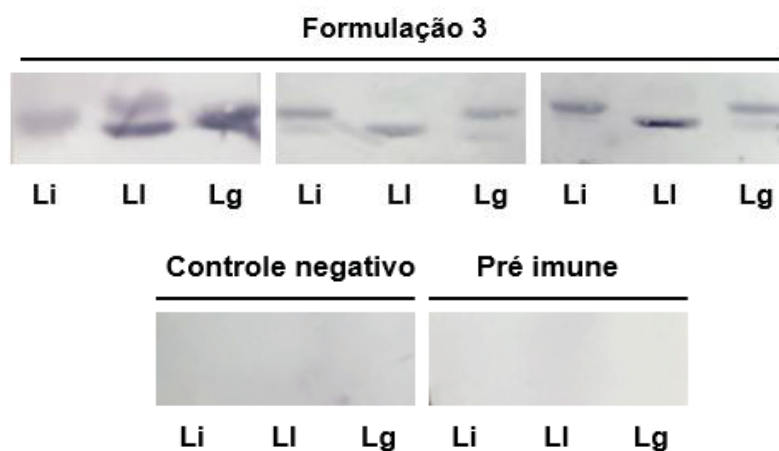
NOTA: n= 3. ALT, AST, GGT e CK-Muscular: U/L; Proteína total: g/dL, Ureia: mg/dL, Creatinina: mg/dL. Valores em vermelho: acima da referência para a espécie (TABELA 5). Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados. ANOVA com pós teste Sidak.

4.4 IMUNOGENICIDADE DAS FORMULAÇÕES 1, 2 E 3.

A fim de avaliar a produção de anticorpos frente aos venenos loxoscélicos estimulada pelas formulações 1, 2 e 3 foram realizados os ensaios de *Western Blot* e ELISA. No ensaio de *Western Blot* foi possível verificar que os animais vacinados com a formulação 3 foram capazes de produzir anticorpos frente aos venenos das 3 espécies de *Loxosceles* avaliadas (FIGURA 12). No mesmo ensaio a presença de anticorpos nos animais vacinados com as formulações 1 e 2 não foi detectada.

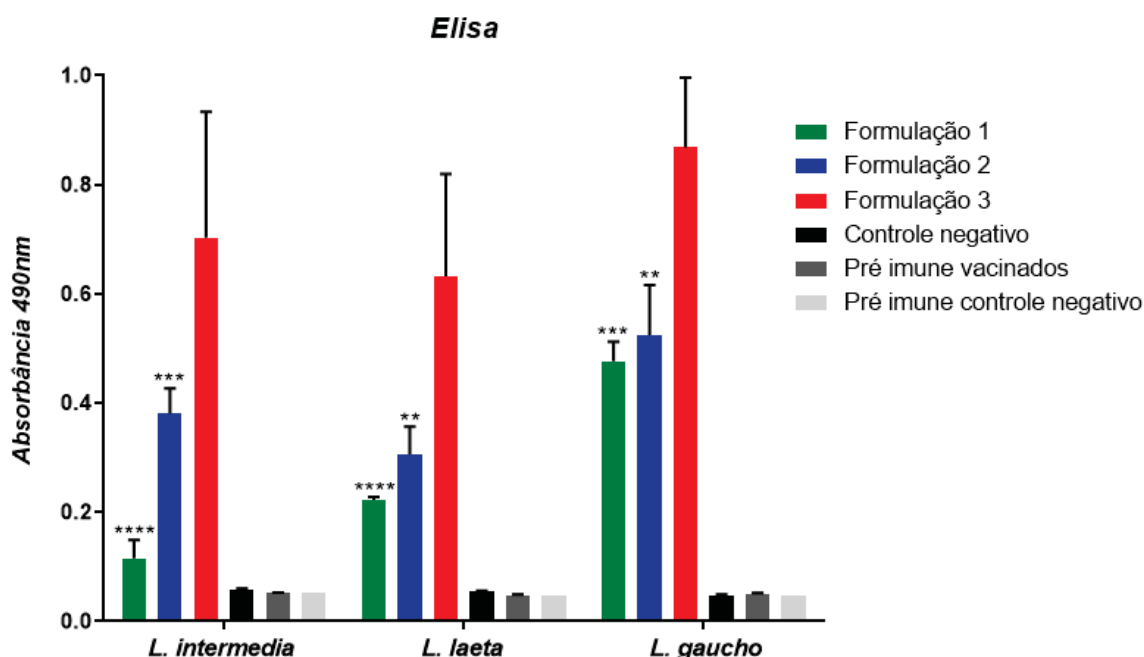
O ensaio de ELISA demonstrou que todas as formulações foram capazes de estimular a produção de anticorpos frente aos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* quando comparados com o soro pré imune (resultados estatisticamente significativos) (FIGURA 13). Não foram detectados anticorpos nos animais controle negativo. O ensaio também demonstrou a produção de anticorpos contra as toxinas dos venenos induzidos pela formulação 3 foi superior em termos de quantidade às formulações 1 e 2.

FIGURA 12 – REATIVIDADE IMUNOLÓGICA (*Western Blot*) DE ANIMAIS VACINADOS COM A FORMULAÇÃO 3.



Western Blot. Os venenos de *L. intermedia* (Li), *L. laeta* (LI) e *L. gaucho* (Lg) (2,5 µg) foram separados por SDS-PAGE sob condições redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose que foram expostas ao soro de animais vacinados com a formulação 1, 2 e 3 (1:5.000). As imagens das três membranas indicadas com "Formulação 3" se referem aos resultados das reações com soros de três coelhos imunizados com a formulação 3 (representativo de 9 animais). A produção de anticorpos estimulada pelas vacinações 1 e 2 não foi imunodetectada nas condições avaliadas (dados não mostrados). O soro de animais controle negativo e pré imune de 5 animais foram avaliados, a imagem escolhida é representativa desses grupos. Para a detecção de reações imunológicas foi utilizado anti-IgG secundário conjugado à fosfatase alcalina (1:5.000) e a reação foi revelada com BCIP/NBT.

FIGURA 13 - REATIVIDADE IMUNOLÓGICA (ELISA) DE ANIMAIS VACINADOS COM AS FORMULAÇÕES 1, 2 E 3.



Reatividade contra os venenos de *L. intermedia* (A), *L. laeta* (B) e *L. gaucho* (C) dos soros de animais vacinados com as formulações 1, 2 e 3 através de ELISA. Placas MaxiSorp (NUNC) foram sensibilizadas com solução de veneno de *Loxosceles*. As absorbâncias foram medidas em 490 nm. Os desvios padrões médios estão representados, com níveis de significância **** $p \leq 0,0001$ e *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ ANOVA com pós teste Tuckey comparando a produção de anticorpos estimulada pela formulação 3 com as formulações 1 e 2. Todas as formulações foram capazes de estimular a produção de anticorpos em relação ao soro dos animais controle negativo e do soro pré imune. A única diferença estatisticamente significativa observada em relação aos venenos foi na formulação 1 entre os venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho*.

4.5 VACINAÇÃO EM CAMUNDONGOS: PROTEÇÃO FRENTE AO LOXOSCELISMO SISTÊMICO

A eficácia da vacinação na proteção frente à danos sistêmicos causados pelo veneno loxoscélico também foi avaliada em camundongos. A vacinação mostrou-se eficaz na proteção desses animais frente à morte causada pelo veneno loxoscélico. Camundongos vacinados tiveram redução de 79,17% frente a letalidade causada pelo veneno de *L. intermedia* (10 µg) (TABELA 11).

TABELA 11– EFEITO PROTETIVO DA VACINAÇÃO FRENTE À LETALIDADE EM CAMUNDONGOS CAUSADA PELO VENENO DE *Loxosceles intermedia*

Tempos	Letalidade camundongo	
	Controle	Vacinados
0 h	0/24	0/24
24 h	16/24	1/24
48 h	22/24	5/24
72 h	24/24	5/24
Proteção (%)	79,14%	

NOTA: Letalidade em camundongos dos grupos vacinados e controle negativo (C-) após a aplicação do veneno de *Loxosceles intermedia* (10 µg). Esse ensaio foi realizado 10 dias após o término do esquema de vacinação. Os animais foram acompanhados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após aplicação. C-: animais que receberam apenas PBS e adjuvante como vacina. Vacinados: animais que receberam 30, 60 e 100 µg de FLDs na formulação vacinal. Os dados tabelados representam os resultados de 3 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Loxoscelismo é o conjunto de sinais e sintomas observados após o acidente com aranhas do gênero *Loxosceles*. Esse quadro pode ocorrer de forma cutânea e/ou sistêmica. Apesar de ser considerado um problema de saúde pública no Brasil, com 7.992 casos notificados ao SINAN-MS e 9 óbitos no ano de 2017, ainda não existe uma terapia definitiva para o loxoscelismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; SWANSON & VETTER, 2006; HOGAN *et al.*, 2004; WENDELL, 2003).

A busca por novas terapias para o loxoscelismo muitas vezes é pautada nas toxinas presentes no veneno. Dentre essas toxinas destacam-se as fosfolipases-D (FLDs). Sozinhas, essas enzimas são capazes de reproduzir experimentalmente a maioria dos sinais e sintomas do loxoscelismo cutâneo e sistêmico (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017). Isso, torna essas moléculas importantes alvos para o desenvolvimento de novas terapias (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019). No presente estudo, FLDs mutadas recombinantes foram utilizadas como antígenos em uma proposta de terapia preventiva ao loxoscelismo.

A obtenção dos antígenos vacinais foi realizada em um sistema procarioto de expressão, a cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, que já mostrou alta eficiência na produção de diversas FLDs mutadas recombinantes de *L. intermedia* (VUITIKA *et al.*, 2016; CHAIM *et al.*, 2006). Análise proteômica por espectrometria de massa de

venenos de 10 espécies diferentes de *Loxosceles* sp. revelou que FLDs possuem massa entre 31,0 e 35,0 kDa (BINFORD *et al.*, 2009). No presente estudo, a análise eletroforética das amostras coletadas antes e após a expressão das FLDs revelou o aparecimento de uma banda de aproximadamente 35 kDa. Além disso, o mesmo ensaio demonstrou a purificação dessas moléculas com uma alta taxa de pureza, comprovando que todas as FLDs foram obtidas com sucesso nas condições anteriormente padronizadas para FLDs mutadas recombinantes de *L. intermedia* (VUITIKA *et al.*, 2016; CHAIM *et al.*, 2006).

Fosfolipases-D são conhecidas pela capacidade de catalisar a hidrólise de diversos substratos lipídicos (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005). FLDs de *L. intermedia* com mutações sítio dirigidas em resíduos que estão envolvidos na hidrólise do substrato lipídico (LiRecDT1 H12A, LiRecDT1 H12A-H47A, LiRecDT1 E32A-D34A e LiRecDT1 Y228A) possuem uma drástica diminuição na atividade fosfolipásica (VUITIKA *et al.*, 2016; KUSMA *et al.*, 2008). Além da perda da capacidade fosfolipásica essas FLDs também não foram capazes de induzir com eficiência: Hemólise, nefrotoxicidade, citotoxicidade, permeabilidade vascular e dermonecrose (VUITIKA *et al.*, 2016, CHAIM *et al.*, 2011; KUSMA *et al.*, 2008), o que tornou essas moléculas importantes bioferramentas para o estudo e tratamento do loxoscelismo.

No presente estudo, essas mutações também foram realizadas em FLDs de *L. laeta* e *L. gaucho*. Por meio do ensaio de atividade esfingomielinásica foi possível constatar que todas as isoformas mutantes reduziram drasticamente a capacidade de clivar esfingomielina (SM) quando comparadas com as isoformas selvagens, mesmo com uma alta massa de FLD usada no experimento (100 µg). Ainda, as isoformas com mutações sítio dirigidas também não foram capazes de induzir lesões dermonecróticas em coelhos, mesmo aplicadas em grande quantidade (50 µg). O contrário foi observado para a isoforma selvagem (LiRecDT1) que foi capaz de hidrolisar SM e induzir lesões dermonecróticas, como já mostrado anteriormente (CHAIM *et al.*, 2006).

No contexto do envenenamento, a clivagem dos lipídeos de membrana promovida pelas FLDs libera metabólitos bioativos, que são apontados como os principais responsáveis por promover as atividades biológicas observadas no loxoscelismo (GREMSKI *et al.*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005). A clivagem de esfingomielina e lisofosfatidilcolina, por exemplo, produz

ceramida-1-fostato e ácido lisofosfatídico, descritos como mediadores de resposta inflamatória (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005). Esses, produtos da degradação de fosfolipídeos de membrana são apontados como os promotores de vários sinais e sintomas do loxoscelismo cutâneo e sistêmico.

Confirmando a importância da atividade fosfolipásica das FLDs na promoção dos sinais e sintomas do loxoscelismo, estudos relataram que homólogos de FLDs desprovidos de atividade catalítica, como por exemplo LiRecDT3, também são incapazes de induzir a formação de lesões dermonecroticas, hemólise, agregação plaquetária e permeabilidade vascular (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2006).

Apesar das FLDs de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* pertencerem a diferentes espécies e não possuírem a mesma sequência aminoacídica, já é de conhecimento que os aminoácidos envolvidos na catálise do substrato são altamente conservados ao longo do gênero *Loxosceles* (MURAKAMI *et al.*, 2005). O fato das mesmas mutações sítio dirigidas realizadas em LiRecDT1 por VUITIKA e colaboradores (2016) também alterarem a atividade de LiRecDT1 e LgRecDT1 ressalta a importância desses resíduos de aminoácidos para a atividade das FLDs loxoscélicas. Contrariamente, LiRecDT3, isoforma sem atividade, possui todos os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico conservados, porém, os aminoácidos perto desses sítio ativo são ligeiramente diferentes dos encontrados em FLDs com atividade, o que pode explicar a ausência de atividade fosfolipásica dessa molécula (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2006).

Estudos com FLDs recombinantes selvagens já demonstraram que essas toxinas contêm sequência, identidade de epítomos e reatividade cruzada antigênica com as fosfolipases-D do veneno nativo loxoscélico (APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006). Recentemente, VUITIKA e colaboradores (2016) demonstraram que isoformas mutadas de LiRecDT1, entre elas LiRecDT1 Y228A, foram reconhecidas por anticorpos contra o veneno de *L. intermedia* e LiRecDT1. No presente estudo as isoformas mutadas recombinantes LiRecDT1 H12A-H47A e LgRecDT1 E32A-D34A também provaram ter epítomos conservados das FLDs do veneno nativo, demonstrando que as isoformas recombinantes com mutações sítio dirigidas mantiveram a maior parte dos epítomos dessas proteínas.

A reatividade cruzada entre os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* já foi demonstrada anteriormente. Um soro produzido contra o veneno bruto de *L. gaucho* foi capaz de reconhecer toxinas dos venenos de *L. laeta* e *L. intermedia*, destacando a similaridade entre epítomos dos 3 venenos para diversas toxinas (BARBARO *et al.*, 1996). Isso também já foi demonstrado para FLDs das mesmas espécies. Anticorpos produzidos contra o veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* mostraram-se capaz de reconhecer epítomos lineares e conformacionais de 5 isoformas de FLDs de *L. intermedia* (BUCH *et al.*, 2015). Ainda, anticorpos produzidos contra FLDs de *L. intermedia* (recLiD1) foram capazes de reconhecer o veneno total de diversas espécies loxoscélicas, entre elas *L. laeta* e *L. gaucho* (FELICORI *et al.*, 2006). Juntos, esses resultados demonstram que venenos de diferentes espécies loxoscélicas contem FLDs com epítomos imunogênicos altamente conservados e que isoformas recombinantes de FLDs, tanto selvagens quanto mutadas, conservam epítomos das enzimas nativas, e os dados apresentados nesse trabalho corroboram com essas observações.

As FLDs recombinantes, independentemente se possuíam mutações ou não, foram reconhecidas por anticorpos produzidos contra o veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Porém, é importante destacar que as proteínas foram mais bem reconhecidas por seus anticorpos homólogos, o que pôde ser evidenciado pela diferente intensidade das bandas no ensaio de *western blot*. Portanto, as FLDs loxoscélicas apesar de compartilharem boa parte dos seus epítomos imunogênicos, não possuem 100% de similaridade entre eles, o que demonstra a importância do uso de FLDs das 3 espécies em uma vacina, constituindo uma formulação trivalente capaz de proteger o organismo da ação danosa das FLDs do veneno das 3 espécies.

Após a obtenção dos antígenos, comprovação da inatividade e imunogenicidade, diferentes ensaios foram realizados a fim de testar se os antígenos escolhidos são capazes de proteger animais frente o loxoscelismo cutâneo e sistêmico. Para isso 3 formulações vacinais, com diferentes quantidades de antígenos, foram testados em coelhos.

Em nossos ensaios todos os animais não vacinados desafiados com o veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* apresentaram os sinais macroscópicos do loxoscelismo cutâneo (ISBISTER & FAN, 2011). Três horas após a inoculação do veneno a maioria dos animais apresentavam: edema, eritema e equimose local, e em 24 horas todos apresentaram lesão dermonecrotica característica com espalhamento

gravitacional. A lesão progrediu para a formação de crosta necrótica observada na maioria dos animais em até 96 horas. Todos esses resultados corroboram com os achados macroscópicos após a inoculação experimental de veneno de *L. intermedia* em coelhos (PAULI *et al.*, 2009). Além disso, as lesões cutâneas encontradas em coelhos se assemelham muito às lesões descritas no loxoscelismo cutâneo em humanos (ISBISTER & FAN, 2011). Isso demonstra a eficácia dos venenos e doses utilizados em reproduzir lesões cutâneas características e valida o modelo animal escolhido para testar o efeito protetor da vacina frente ao loxoscelismo cutâneo.

Em um ensaio inicial, duas formulações vacinais foram testadas, com diferentes massas de antígenos. Formulação 1: 50 µg, 100 µg e 300 µg de antígenos. Formulação 2: 100 µg, 150 µg e 400 µg de antígenos. Em comparação com os animais controle negativo, os animais vacinados desenvolveram lesões mais brandas após a inoculação dos venenos das três espécies. Entretanto, após 24 horas alguns animais apresentaram edema, eritema, equimose e dermonecrose, ainda que esses sintomas fossem visualmente menos expressivos do que os que se desenvolveram nos animais não vacinados. Não houve diferença significativa na resposta dos animais pertencentes à um ou outro esquema de imunização quando desafiados com os venenos, mostrando que a diferença nas quantidades de antígeno utilizadas não resultou em diferentes níveis de proteção. No ensaio de ELISA, também não foram observadas diferenças significativas na produção de anticorpos comparando ambas as formulações, o que pode explicar o resultado obtido macroscopicamente.

No entanto, esse ensaio inicial sustentou a eficácia dos antígenos escolhidos, porém revelou que esses esquema de imunização não protegeu integralmente os animais dos efeitos cutâneos desencadeados pelas toxinas. Ademais, esses ensaios iniciais mostraram que, nessas quantidades testadas, os antígenos eram seguros, pois durante o período de imunização os animais não demonstraram nenhuma alteração clínica que indicasse algum efeito colateral decorrente da inoculação do antígeno combinado com o adjuvante, segundo relato de médico veterinário que acompanhou os animais durante todo o período.

Com o objetivo de aumentar a produção de anticorpos e, consequentemente, reforçar a proteção dos animais contra os efeitos tóxicos dos venenos, a quantidade de antígeno utilizada foi ampliada (HARLOW & LANE, 1988). Dessa forma, o terceiro protocolo de imunização avaliado continha 3 imunizações com 300 µg, 600 µg e 1mg dos antígenos. Sendo 1mg o limite superior de massa recomendado para proteínas

não tóxicas para coelhos (HARLOW & LANE, 1988). Não foi possível constatar melhora ou diminuição das lesões cutâneas desencadeadas pelos venenos loxoscélicos nos animais desse grupo em relação aos animais vacinados com menor quantidade de antígeno (formulações 1 e 2). Isso sugere que esse incremento na massa de antígeno não resultou em uma melhor proteção contra a ação local das toxinas.

De fato, ensaios de ELISA e *Western Blot* comprovaram a eficácia das vacinações em produzir anticorpos em animais vacinados capazes de reconhecer as FLDs nativas do veneno loxoscélico. Ainda, o ensaio de ELISA demonstrou a que a formulação 3 foi mais eficiente na indução da produção de anticorpos do que as formulações 1 e 2 (diferenças significativas não foram observadas entre essas 2 formulações). O ensaio de *Western Blot* também sugeriu o mesmo, visto que os anticorpos produzidos pelas formulações 1 e 2 não foram suficientes para a imunodeteção na mesma diluição que os anticorpos produzidos pela formulação 3. Esses ensaios de detecção de anticorpos em conjunto com os ensaios macroscópicos, sugerem que o incremento na quantidade de anticorpos produzidos não refletiu em melhora na proteção contra a ação local das toxinas loxoscélicas.

O ensaio de ELISA não demonstrou uma resposta de anticorpos significativamente superior frente a algum dos venenos loxoscélicos (exceto na formulação 1 comparando os venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho*). Apesar disso, macroscopicamente, as 3 formulações vacinais testadas desencadearam respostas superiores frente ao veneno de *L. laeta* e *L. gaucho* do que frente ao veneno de *L. intermedia*. Mais uma vez demonstrando que a produção de anticorpos não está necessariamente relacionada com a capacidade de neutralização dos efeitos biológicos locais. Na terceira formulação vacinal, o acompanhamento da progressão das lesões dos animais vacinados desafiados com o veneno de *L. intermedia* revelou a formação de crosta dermonecrótica em todos os animais em até 96 horas. Já os animais desafiados com os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* não apresentaram a formação de crosta dermonecrótica no mesmo período avaliado. Apesar disso, a maioria dos animais apresentavam placa marmórea.

A placa marmórea caracteriza-se pelas suas cores azul (devido à equimose), branca (isquemia) e vermelha (eritema) (ISBISTER & FAN, 2011). A isquemia ocorre por privação do suprimento sanguíneo e está diretamente relacionada com a formação de necrose isquêmica (ADIGUN *et al.*, 2019). Portanto, os animais vacinados

desafiados com o veneno de *L. laeta* e *L. gaucha* apresentavam sinais macroscópicos do início do desenvolvimento de dermonecrose com possível posterior formação de crosta dermonecrótica.

É fato que essa é a primeira vez que FLDs de veneno de aranhas marrons com mutações sítio-dirigidas são utilizadas como antígenos em protocolos de imunização que podem contar com uma quantidade tão alta de antígeno aplicado. Trabalhos anteriores avaliaram preparações de antígenos contendo epítomos dessas FLDs. ARAÚJO e colaboradores (2003), por exemplo, desenvolveram uma vacina anti-loxoscélica formulada com FLD fusionada sem atividade dermonecrótica (3 doses de 20 µg) que não demonstrou capacidade de proteger totalmente coelhos contra a dermonecrose causada pelo veneno de *L. intermedia*. Apesar disso, as lesões também foram muito mais brandas do que as encontradas nos animais controle negativo (ARAÚJO *et al.*, 2003). Ainda, uma vacina com base em peptídeos de FLD demonstrou capacidade de proteção de 60% frente à dermonecrose causada pelo veneno de *L. intermedia* (de MOURA *et al.*, 2011).

Recentemente, uma formulação vacinal que usou como antígeno uma quimera recombinante contendo epítomos lineares e conformacionais de FLDs de *L. intermedia* e *L. gaucha*, além de epítomos lineares de metaloprotease e hialuronidase de *L. intermedia* (rMEPLox) foi testada (LIMA *et al.*, 2018a). Neste estudo foi relatada uma proteção integral frente à dermonecrose causada pelo veneno de *L. intermedia* em até 72 horas (LIMA *et al.*, 2018a). Contudo, neste estudo os animais receberam 7 doses da vacina com rMEPLox e imagens das lesões cutâneas não foram mostradas para avaliação da presença de placa marmórea com pontos isquêmicos.

Nem mesmo o soro comercial loxoscélico utilizado no Brasil demonstrou capacidade de inibir completamente as atividades causadas pelo veneno de *L. intermedia*. Este soro apresentou capacidade de diminuir em 87% a área de dermonecrose em coelhos quando administrado em até 6 horas após o envenenamento (PAULI *et al.*, 2009).

Além da formação de dermonecrose outros sinais clínicos também são comumente observados após acidentes envolvendo *Loxosceles* sp., entre esses estão edema, eritema e equimose (ISBISTER & FAN, 2011). Macroscopicamente, a vacina avaliada no presente trabalho não foi integralmente protetiva frente a equimose e eritema na maioria dos animais em nenhum dos esquemas de vacinação testados. Porém, é possível observar uma grande diminuição tanto em área quanto em

intensidade desses parâmetros nos animais vacinados. Além disso, a vacina mostrou grande capacidade em reduzir a formação de edema. Mensurações demonstraram que, em média, a redução no desenvolvimento de edema foi na ordem de 87%, 89% e 96% para os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, respectivamente.

PAULI e colaboradores (2009) relataram que a soroterapia comercial antiloxoscélica também não é plenamente efetiva na proteção dos animais no que se refere ao desenvolvimento de edema, eritema e equimose. A soroterapia só demonstrou redução significativa no edema quando aplicada em até 6 horas após o envenenamento (PAULI *et al.*, 2009). Ainda nesse estudo, tanto os animais do grupo controle quanto os animais tratados com o soro antiloxoscélico apresentaram pico de formação de edema em 24 horas, corroborando com nossos resultados em que o pico da formação de edema ocorreu entre 24 e 48 horas.

Outras formulações vacinais antiloxoscélicas também não tiveram capacidade de reduzir integralmente todos os sinais clínicos do loxoscelismo. DE MOURA e colaboradores (2011) observaram 80% de proteção frente aos danos hemorrágicos causados pelo veneno de *L. intermedia* em animais vacinados com mimotopos de FLDs. Esses imunógenos foram capazes de proteger apenas parcialmente frente à formação de edema, reduzindo esse parâmetro em apenas 30%. A formulação vacinal com antígenos de rMEPLox, apesar de reduzir completamente a área dermonecrotica, não foi avaliada frente aos outros parâmetros cutâneos e imagens não foram mostradas para comparação (LIMA *et al.*, 2018a).

A rapidez da ação das toxinas do veneno loxoscélico pode ser uma das explicações para os métodos de tratamento e de prevenção ao loxoscelismo não serem completamente eficazes frente às lesões cutâneas. Estudos histopatológicos de biópsias de pele de coelhos inoculados experimentalmente com veneno de *L. intermedia* revelaram que após 4 horas da inoculação há ocorrência de um intenso infiltrado inflamatório (basicamente neutrófilos) no tecido conjuntivo e tecidos subcutâneos mais profundos, desorganização das fibras colágenas com deposição de fibrina no tecido conjuntivo indicando um aumento da permeabilidade vascular com exsudação e edema intersticial (OSPEDAL *et al.*, 2002). No mesmo tempo também foi detectada trombose dos vasos sanguíneos dérmicos e degeneração das paredes dos vasos sanguíneos (OSPEDAL *et al.*, 2002). PAULI e colaboradores (2009) verificaram a ação macroscópica do veneno já nos primeiros 90 minutos após a inoculação do veneno, observando a instalação de eritema, edema e equimose. Esses

efeitos precoces do veneno também foram visualizados macroscopicamente neste trabalho nos animais do grupo controle negativo e na maioria dos animais vacinados, embora os efeitos do veneno foram mais brandos nos últimos. O estudo de PAULI e colaboradores (2009) constatou que a dermonecrose macroscópica só ocorreu a partir de 12 horas após inoculação de veneno.

Embora após quatro horas da inoculação do veneno ainda não sejam observadas necrose tecidual e hemorragia, nesse período inicial já está instalado um intenso quadro inflamatório no local. Dessa forma já há naquela região a presença e ação de inúmeros mediadores inflamatórios que produzem um cenário patológico difícil de ser controlado.

Nesse contexto, também é necessário avaliar o mecanismo de ação do veneno. Já é sabido que a necrose ocorre quando há a quebra da integridade da membrana celular e que FLDs são capazes de degradar diversos lipídeos de membrana (DUNBAR *et al.*, 2019; LAJOIE *et al.*, 2015; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005). O rompimento da integridade da membrana leva a um fluxo de íons e fluídos da matriz extracelular provocando inchaço das organelas (DUNBAR *et al.*, 2019). Quando as membranas das organelas se rompem são liberados no citosol diversas enzimas proteolíticas, causando uma cascata de degradação de outras células (DUNBAR *et al.*, 2019).

Porém, atualmente, acredita-se que a necrose pode também ocorrer por um evento programado (necroptose) resultante de um processo regulado que pode ser favorecido pelo sistema imunológico (PASPARAKIS & VANDENABEELE; 2015; VANDEN BERGHE *et al.*, 2014). No nível celular, citocinas, incluindo interleucina e fator de necrose tumoral (TNF), medeiam a comunicação através de vias de sinalização e parecem desencadear o processo de necroptose até mesmo em células que não sofreram a ação do veneno (DUNBAR *et al.*, 2019).

A clivagem de lipídeos de membrana por FLDs loxoscélicas já foi relacionada com a liberação de metabólitos bioativos. Por exemplo, a clivagem de esfingomielina libera ceramida, descrita como mediador de resposta inflamatória (LAJOIE *et al.*, 2015; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; LEE & LYNCH, 2005). Dentre as diversas funções das ceramidas, elas já foram descritas como importantes reguladores de TNF (HANNUN, 1994). DOMINGOS e colaboradores (2003) demonstraram *in vitro* que a ação do veneno de *L. gaucho* associado com esfingomielina exógena em

camundongos, que normalmente não desenvolvem dermonecrose após inoculação desse veneno, induz a liberação de TNF- α por macrófagos, gerando dermonecrose.

Esses resultados reforçam a ideia de que a dermonecrose pode ser desencadeada rapidamente através de diversas vias e sem a necessidade de muitas FLDs ativas. O que sustenta o fato de que a ausência de sinais clínicos em animais vacinados ou até mesmo na soroterapia seja algo muito difícil de alcançar. Geralmente, mesmo na soroterapia, o que se busca é a diminuição dos sinais clínicos do loxoscelismo.

Nem mesmo a vacinação de animais com o veneno total de *L. intermedia* demonstrou 100% de redução dos sinais clínicos do loxoscelismo cutâneo. MOURA e colaboradores (2011) obtiveram 90% de redução da dermonecrose e dos efeitos hemorrágicos e apenas 15% em redução de edema frente ao veneno total. Animais vacinados com esse veneno e desafiados com uma FLD recombinante (LiD1) apresentaram 90% de redução na dermonecrose e efeitos hemorrágicos e 20% na redução de edema (DIAS-LOPES *et al.*, 2010). Estudos que também sustentam a agilidade da ação das moléculas do veneno e desencadeamento de um processo irreversível de necrose.

Ainda, a dificuldade de os anticorpos circulantes chegarem ao local de ação do veneno pode ser mais um dos problemas para o combate eficaz do loxoscelismo cutâneo. Estudos mostram que os antivenenos em geral oferecem pouca proteção contra os danos no tecido local por causa da rapidez com a qual esses tecidos são degradados ou porque o antiveneno administrado sistemicamente falha em atingir o tecido local (KEMPARAJU *et al.*, 2006).

Outro fator que não pode deixar de ser considerado são as outras toxinas presentes no veneno, visto que os antígenos utilizados no nosso esquema de vacinação são somente FLDs. Três principais enzimas com ação sobre componentes da matriz extracelular (MEC) já foram descritas no veneno loxoscélico, são elas: as metaloproteases, as serinoproteases e as hialuronidases (FERRER *et al.*, 2013; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; VEIGA *et al.*, 2000; FEITOSA *et al.*, 1998).

Essas moléculas parecem ter papel primordial na desorganização MEC o que está diretamente relacionado com os sinais e sintomas do loxoscelismo. Experimentalmente, as hialuronidases foram relacionadas ao espalhamento gravitacional do veneno e da formação da hemorragia local (DA SILVEIRA *et al.*, 2007;

FERRER *et al.*, 2013). Ainda, por degradarem componentes da MEC, é sugerido que as metaloproteases e serinoproteases também ajudem no espalhamento local das outras toxinas do veneno. A falta de anticorpos neutralizantes contra essas moléculas também pode explicar a presença de edema, eritema e equimose nos animais vacinados.

Além das enzimas já citadas, a TCTP (do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*), também presente no veneno de *Loxosceles sp.*, também já foi relacionada com os sintomas clínicos do loxoscelismo. Recentemente, a isoforma recombinante LiTCTP sozinha foi capaz de promover aumento da permeabilidade vascular e edema *in vivo* (BOIA-FERREIRA *et al.*, 2019).

Ademais, além das toxinas do veneno poderem atuar diretamente como fatores de espalhamento, estudos mostram que a ligação de FLDs loxoscélicas à queratinócitos induz o aumento da expressão e secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) endógenas (CORRÊA *et al.*, 2016; PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2006). Essas MMPs foram relacionadas à morte celular de queratinócitos, promovendo a dermonecrose independente de veneno (CORRÊA *et al.*, 2016; PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2006).

O sinergismo entre as toxinas do veneno parece ser primordial para a produção dos sinais e sintomas do loxoscelismo. Já é de conhecimento que o espalhamento gravitacional, edema e permeabilidade vascular são muito mais intensos após a exposição de animais ao veneno total do que à FLDs sozinhas (APPEL *et al.*, 2008). Ainda, estudos comprovaram que a hialuronidase e a TCTP sozinhas desencadeiam efeitos muito brandos, porém têm capacidade de potencializar os efeitos das FLDs (BOIA-FERREIRA *et al.*, 2019; FERRER *et al.*, 2013). A produção de anticorpos neutralizantes contra FLDs loxoscélicas pode explicar o sucesso da vacinação em reduzir bruscamente edema, eritema e equimose mesmo não produzindo antígenos contra todas as moléculas do veneno. Isso porque, estando o efeito das FLDs parcialmente neutralizados, o efeito dessas outras moléculas sozinhas não é tão efetivo quanto em conjunto com as FLDs.

O efeito protetivo da vacinação frente ao loxoscelismo sistêmico foi avaliado por meio da vacinação de coelhos e camundongos. Em coelhos, análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas nos animais vacinados e não vacinados (controle negativo) antes da inoculação e 24 horas após a exposição aos venenos loxoscélicos.

Nos animais não vacinados, observou-se uma diminuição na contagem de leucócitos totais no sangue periférico 24 horas após o desafio com o veneno de *L. intermedia*. Esse mesmo achado foi feito por da Silva e colaboradores (2003) no sangue periférico de coelhos tratados com veneno de *L. intermedia*. Além disso, os nossos resultados mostram, pela contagem relativa (convertida em absoluta) dessas células, que houve diminuição na contagem tanto de heterofilos quanto de linfócitos. A diminuição do número de heterofilos circulantes corrobora com os achados de estudos anteriores (PAULI *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.* 2003), que relacionaram esse achado com o extenso influxo de heterofilos nos tecidos. Já foi verificado que após a ativação do sistema imunológico pelo veneno, alguns dos respondedores de primeira linha são leucócitos (DUNBAR *et al.*, 2019), que respondem prontamente migrando para os tecidos lesionados. A contagem de linfócitos também diminuiu nesses animais após o desafio com o veneno de *L. intermedia*. Esse achado também foi relatado por TAVARES e colaboradores (2004) 24 horas após a inoculação de veneno de *L. gaucho* em coelhos. Essa diminuição de linfócitos circulantes pode ser decorrente de uma depressão da medula óssea após 24 horas da inoculação de veneno loxoscélico já descrita por DA SILVA e colaboradores (2003). Nos animais não vacinados tratados com o veneno de *L. laeta* a contagem total de leucócitos não variou 24 horas após o desafio com o veneno, e a contagem diferencial mostrou que o número de heterofilos e linfócitos também não foi alterado após a inoculação desse veneno.

Ao contrário dos animais controle, os animais vacinados desafiados com o veneno de *L. intermedia* e *L. laeta* apresentaram aumento no número de leucócitos totais. Após o desafio com o veneno de *L. intermedia*, o aumento do número de linfócitos no sangue periférico desses animais após a inoculação de veneno foi mais significativo do que o aumento do número de heterofilos, que praticamente foi mantido. O número de linfócitos circulantes também aumentou nos animais vacinados após o desafio com veneno de *L. laeta*. É de conhecimento que os anticorpos são produzidos por uma subpopulação de linfócitos, os linfócitos B. Essas células quando encontram o antígeno (FLDs nativas do veneno) são estimuladas a se dividir e se diferenciar em plasmócitos e células B de memória (MOSER & LEO, 2010). A maioria dos plasmócitos voltam para a medula óssea, onde produzem grandes quantidades de anticorpos solúveis (MOSER & LEO, 2010). Portanto, o aumento na porcentagem de linfócitos encontrados nesse estudo nos animais vacinados sugere uma ativação do

sistema imune, com uma proliferação maciça de linfócitos B de memória produzidos ao longo do esquema de vacinação, agora em resposta à presença de fosfolipases-D do veneno total. A diminuição do número de heterofilos no sangue periférico de animais vacinados tratados com veneno de *L. laeta* vai contra os achados do grupo tratado com veneno de *L. intermedia* e também não corrobora com os achados macroscópicos da pele desses animais após 24 horas do desafio com o veneno (ausência de dermonecrose). Outro problema hematológico correlacionado ao veneno de *Loxosceles* é a hemólise intravascular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; FUTRELL, 1992). Diversas FLDs loxoscélicas já demonstraram capacidade *in vivo* de causar hemólise (FERNANDES PEDROSA *et al.*, 2002; VUITIKA *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013). CHAVES-MOREIRA e colaboradores (2011) demonstraram que a hemólise de eritrócitos humanos induzida por FLDs é dependente da clivagem de fosfolipídios de membrana. Os produtos bioativos gerados são os responsáveis por estimular um influxo de cálcio nos glóbulos vermelhos causando hemólise.

A análise da série vermelha do sangue revelou um decréscimo na contagem de eritrócitos e hematócitos em animais controle e vacinados após a exposição do veneno de *L. intermedia*. Apesar disso, as taxas de hemoglobina permaneceram praticamente inalteradas, indicando ausência de hemólise significativa. Isso também foi observado para animais vacinados desafiados com esse veneno.

Já os animais do grupo controle desafiados com o veneno de *L. laeta* apresentaram alteração estatisticamente significativa em hemoglobina. Nesses animais a contagem de eritrócitos e hematócitos também foi diminuída, resultados que sugerem uma tendência de hemólise. Os animais vacinados também apresentaram decréscimo nesses parâmetros, porém os valores não foram estatisticamente significativos e as diminuições foram menores do que nos animais controle.

Apesar das alterações ocorridas após a inoculação dos venenos loxoscélicos todos os parâmetros avaliados no eritrograma estavam dentro dos parâmetros sugeridos para a espécie (CARPENTER & MARION, 2018).

Da Silva e colaboradores também não verificaram alteração significativa na contagem de eritrócitos e na concentração de hemoglobina do sangue periférico de coelhos tratados com veneno de *L. intermedia*. PAULI e colaboradores (2009) observaram quedas nas contagens de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito apenas em 48 horas após a exposição dos animais ao veneno de *L. intermedia*. Já TAVARES

e colaboradores (2004) encontraram diminuições significativas nesses parâmetros em 72 horas pós inoculação do veneno de *L. gaucho*.

Além disso, é importante observar que ambos os estudos utilizaram maiores quantidades de veneno total (16 µg no de PAULI *et al.* 2009 e 30-40 µg no de TAVARES *et al.* 2004) e que mesmo assim não foram detectados sinais de hemólise intravascular. Nestes estudos, as quedas nas contagens de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito foram relacionadas com o processo hemorrágico observado no local de aplicação do veneno (PAULI *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2004), o que também pode explicar os resultados do eritrograma obtidos neste estudo.

Eritrócitos de coelhos não contém glicoforinas, proteínas de membrana que possuem papel importante na ativação da hemólise mediada por complemento em eritrócitos humanos (TAMBOURGI *et al.*, 2000), o que sugere que coelhos sejam pouco susceptíveis à hemólise indireta (via Sistema Complemento) causada pelo veneno loxoscélico. Isso porque, na hemólise dependente de complemento a ação esfingomielinásica das FLDs ativa metaloproteinases endógenas que removem glicoforinas da membrana de eritrócitos, facilitando a ativação desses pelo Sistema Complemento autólogo, gerando hemólise (TAMBOURGI *et al.*, 2000). Apesar disso, foi demonstrado *in vitro* que eritrócitos de coelho também são susceptíveis a hemólise direta, independente do Sistema Complemento (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

Além de hemólise, no loxoscelismo sistêmico alterações em órgãos também podem ocorrer, mais comumente dos rins e fígado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; LUNG & MALLORY, 2000). Portanto, além das alterações hematológicas também foram avaliados parâmetros bioquímicos sorológicos dos animais controle e vacinados expostos ao veneno.

De fato, o principal motivo de óbitos decorrentes do loxoscelismo é a insuficiência renal aguda (IRA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Estudos das estruturas renais de camundongos expostos ao veneno de *Loxosceles* mostraram citotoxicidade sobre células epiteliais e endoteliais glomerulares, alterações na membrana basal e degeneração das células epiteliais tubulares (LUCIANO *et al.*, 2004). Isoladamente, LiRecDT1 mostrou-se capaz de desencadear efeito nefrotóxico direto, tal como o veneno bruto, sugerindo que a nefrotoxicidade é dependente da atividade fosfolipásica do veneno total (KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006).

A creatinina e a ureia são moléculas filtradas pelos glomérulos renais (ANDREUCCI *et al.*, 2017). Qualquer distúrbio que cause diminuição na perfusão

renal, filtração glomerular ou eliminação da urina eleva as concentrações dessas proteínas na corrente sanguínea (BENSON & PAUL-MURPHY, 1999).

Neste estudo, os níveis de ureia sérica dos animais vacinados que tiveram uma amostra de sangue periférico coletado 24 horas após o desafio com o veneno de *L. gaucho* estavam aumentados. Já os níveis de ureia sérica dos animais pertencentes a todos os outros grupos analisados mantiveram-se dentro dos limites dos valores de referência. Porém, nos animais vacinados e desafiados com o veneno de *L. gaucho*, ao contrário dos níveis de ureia, os níveis de creatinina não estavam aumentados, levando a crer que essa alteração não indica dano renal. Além disso, é importante salientar que muitos fatores influenciam as concentrações de ureia sérica em coelhos e pequenas flutuações nesse indicador são difíceis de interpretar (HARCOURT-BROWN, 2007).

Alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina são observados em pacientes com loxoscelismo sistêmico (NGUYEN & PANDEY, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2008). Apesar disso, não existem estudos mostrando alteração nesses parâmetros em coelhos. A inoculação experimental de veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho* não causou alteração em creatinina e ureia sérica em até 5 dias após envenenamento (PAULI *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2004). Portanto, os dados obtidos em nossos experimentos estão de acordo com a literatura.

Apesar das FLDs loxoscélicas poderem ligar-se diretamente nas estruturas renais, a hemoglobina plasmática liberada durante a hemólise intravascular disseminada é considerada um dos principais fatores que levam à insuficiência renal no loxoscelismo sistêmico (KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006; MÁLAQUE *et al.*, 2002; FUTRELL, 1992). No presente estudo, não foram visualizados sinais contundentes de hemólise intravascular, o que pode explicar a ausência de danos renais nos animais avaliados.

Além disso, a creatinina e ureia sérica não são indicadores sensíveis para função renal comprometida em coelhos e roedores (HARCOURT-BROWN, 2013; HARCOURT-BROWN, 2007). Estudos demonstram que 50 a 75% da função renal tem que ser perdida antes das concentrações de ureia e creatinina sérica aumentarem em coelhos (CAMPBELL, 2004; BENSON & PAUL-MURPHY, 1999). Portanto, outros marcadores mais sensíveis teriam que ser avaliados.

Além dos danos renais, sinais de danos hepáticos também já foram descritos em acidentes loxoscélicos (DE SOUZA *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2002). Ratos

inoculados experimentalmente com o veneno de *L. intermedia* e LiRecDT1 desenvolveram danos hepáticos (CHRISTOFF *et al.*, 2008). Contudo, os danos causados pelo veneno loxoscélicos devem-se apenas em parte à ação das FLDs, outras moléculas tem participação importante no desenvolvimento da hepatotoxicidade (CHRISTOFF *et al.*, 2008).

Clinicamente, níveis plasmáticos aumentados de AST e ALT são considerados indicadores importantes de lesões hepáticas celulares (PEICHOTO *et al.*, 2006). Essas enzimas podem ser facilmente detectadas em quantidades muito pequenas e a liberação dessas pode ser causada tanto pela lise celular quanto pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (CHRISTOFF *et al.*, 2008; PEICHOTO *et al.*, 2006 BABCOCK *et al.*, 1981).

Alterações em ALT foram encontradas em animais controle e vacinados. Contudo, essa enzima possui pouca especificidade tecidual em coelhos, não sendo um bom indicador de dano hepático (MEREDITH e RAYMENT, 2000).

Alterações também foram observados em AST após a inoculação do veneno de *L. gaucho* (animais controle e vacinados). Em coelhos, maiores atividades dessa enzima são observadas no fígado e músculo esquelético (MANNING *et al.*, 1974). Ou seja, além de lesões hepáticas reversíveis e necrose celular hepática, aumentos nessa enzima também podem indicar lesão muscular (MANNING *et al.*, 1974). Embora a CK-Muscular seja um marcador mais específico que AST para lesões musculares, a dosagem de AST é frequentemente utilizada como complemento de mudanças observadas em CK-M (KANEKO *et al.*, 1997). No presente estudo, os níveis de CK muscular também se encontraram alterados, indicando que o aumento de AST pode estar relacionado com os danos musculares causados pelo veneno loxoscélico (OSPEDAL *et al.*, 2002). Alterações em AST e CK observadas em 0 horas podem ser devidos à vacinação intramuscular, tanto em animais controle quanto em animais vacinados. Além disso, estudos relacionam o aumento de CK muscular com o esforço exercido pelos animais durante a contenção para coleta de sangue (KORN *et al.*, 2018; HEIN & HARTMANN, 2003).

A dosagem de lactato desidrogenase (LDH) também pode ser utilizada como marcador de danos hepáticos. No entanto, é considerado um parâmetro pouco específico, visto que é uma enzima intracelular e sua liberação na circulação pode ser resultado de um ligeiro dano celular e perda de citoplasma até necrose celular severa o que gera diversos graus de elevação da atividade enzimática (ATALAN *et al.*, 2019).

Uma hemólise leve, por exemplo, já eleva os níveis dessa enzima no soro. No presente estudo, valores elevados de LDH foram observados nos animais antes mesmo da aplicação de veneno. Comprovadamente, uma das limitações importantes para a avaliação desse parâmetro é o uso de anestésicos, a coleta de sangue da maioria dos animais foi realizada através de punção cardíaca após a aplicação de cetamina e xilazina. Agentes anestésicos causam depressão do sistema respiratório e cardiovascular, o que reduz a perfusão tecidual (ATALAN *et al.*, 2019). Com isso, o metabolismo anaeróbico começa a produzir lactato causando um aumento no nível de glicose no sangue (ATALAN *et al.*, 2019). Nessa situação, o fígado produz glicose mais que o normal e os valores de LDH aumentam. Além disso, a intensificação da atividade de LDH e AST pode ser causada por um aumento nas concentrações de agentes anestésicos no fígado (ATALAN *et al.*, 2019). Alterações nesses parâmetros já foram vistas em coelhos após a administração de diversos anestésicos, entre eles a xilazina (ATALAN *et al.*, 2019; GIL, SILVÁN & ILLERA, 2007). O uso de anestésicos e a punção cardíaca também poderiam causar alterações em ALT, visto que essa enzima, em coelhos, é similar no fígado e coração (MEREDITH e RAYMENT, 2000).

Em coelhos, toda a GGT sérica tem origem hepática e níveis elevados dessa enzima podem indicar danos hepatocelulares e estase da bile (MEREDITH e RAYMENT, 2000). No presente estudo, alterações nos níveis séricos dessa enzima foram observadas em animais desafiados com o veneno de *L. intermedia* e *L. laeta*, mas essas alterações já estavam presentes antes mesmo do desafio com o veneno total. Como não é possível relacionar essas modificações com o envenenamento, é possível que elas estejam associadas ao processo de imunização. Além disso, é interessante observar que animais desafiados com o veneno de *L. gaucho* apesar de possuírem alterações em ALT e AST não apresentaram alterações em GGT.

De fato, nenhum teste bioquímico comercial de dosagem dessas enzimas é altamente específico para enzimas hepáticas de coelhos. Para determinar quais tecidos são responsáveis pela elevação de enzimas circulantes causadoras de patologia, o exame físico, a história, a sinalização e outros dados laboratoriais devem ser considerados (BENSON & PAUL-MURPHY, 1999). Portanto, é possível concluir que não há dados suficientes para constatar lesão hepática causada pela vacinação ou pelo envenenamento nos coelhos avaliados no presente estudo.

Estudos anteriores de coelhos inoculados experimentalmente com os venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho* também não encontraram sinais bioquímicos suficientes

para constatação de lesão hepática, mesmo com maiores massas de veneno utilizadas e com avaliações em tempos posteriores (PAULI *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2004).

Apesar dos achados laboratoriais bioquímicos dos coelhos não indicarem lesões renais e hepáticas decorrentes do envenenamento, a análise geral dos resultados antes do desafio com os venenos indica que a vacinação não alterou de forma significativa o estado geral de saúde desses animais.

Coelhos, humanos e porquinhos-da-índia são pouco susceptíveis ao loxoscelismo sistêmico. Isso porque o veneno geralmente fica acumulado no local do acidente evitando a propagação do veneno mas causando necrose (DUNBAR *et al.*, 2019). Estudos sugerem que o veneno de *Loxosceles* não é capaz de produzir dermonecrose em camundongos e ratos porque a esfingomielina é estruturalmente diferente de outras espécies (DOMINGOS *et al.*, 2003). Portanto, nesses animais o veneno tem maior potencial de propagação, resultando mais facilmente nos efeitos letais do loxoscelismo sistêmico (DUNBAR *et al.*, 2019). Sendo assim, camundongos e ratos são modelos animais melhores para o estudo dos benefícios de um protocolo de vacinação na proteção contra o loxoscelismo sistêmico causado pela vacinação.

Sabe-se que o veneno de *Loxosceles* e as FLDs desencadeiam altas taxas de letalidade em camundongos. RIBEIRO e colaboradores (2007) em um ensaio de nesse modelo animal compararam as taxas de letalidade induzidas pelo veneno de *L. intermedia* e LiRecDT1. Neste, 50 µg/kg de veneno total foram capazes de induzir 100% de letalidade em 48 horas, enquanto a mesma quantidade de LiRecDT1 só foi capaz de causar efeitos letais sobre 60% dos animais.

No presente estudo camundongos do grupo controle (não vacinados) apresentaram 100% de letalidade quando desafiados com veneno de *L. intermedia* (10 µg/20 gramas) e camundongos vacinados 21% de letalidade. Esses dados demonstram que a vacina foi capaz de proteger com eficiência camundongos contra os danos sistêmicos.

O uso de FLDs em protocolos de vacinação já demonstrou efeito protetivo em camundongos anteriormente. FELICORI e colaboradores (2006) observaram proteção de 75% frente a 2.5 DL₅₀ (25 µg/20 gramas) de veneno de *L. intermedia* em 48 horas. DIAS-LOPES e colaboradores (2010) usaram um peptídeo sintético com epítomos de FLDs com adjuvante, encontrando 75% de proteção frente a 1.5 DL₅₀ (15 µg/20 gramas) em 24 horas. Porém, neste estudo, 30% dos animais não vacinados ainda se

encontravam vivos neste tempo.

Apesar desses estudos terem demonstrado proteção frente a massas maiores do veneno, o método de dosagem do veneno não foi exposto. Além disso, no presente trabalho o parâmetro utilizado para o desafio foi a quantidade de proteína presente nos venenos utilizados, e não a DL_{50} . Venenos com a mesma concentração de proteínas podem ter toxicidades bem diferentes, enquanto venenos com a mesma toxicidade podem ter concentrações de proteína bem diferentes (EL HAFNY *et al.*, 2002). Ademais, esses estudos utilizaram como adjuvantes os reagentes de Freund completo e incompleto. A superioridade na produção de anticorpos circulantes produzidos por esse adjuvante em camundongos em comparação com o hidróxido de alumínio já foi relatada anteriormente (TRIPATHI & SHRIVASTAVA, 2018).

Estudos demonstraram que o produto da incubação de veneno de *L. intermedia* com anticorpos produzidos contra FLDs inteiras ou epítomos selecionados não foi capaz de causar letalidade em camundongos (ARAUJO *et al.*, 2003), sugerindo que as FLDs são as únicas moléculas responsáveis por causar letalidade em camundongos. O fato de a vacina com FLDs não ter resultado na mesma proteção nos leva a crer que quantidade de anticorpos circulantes não era o suficiente para neutralizar as FLDs loxoscélicas ou que o mecanismo de ação dessas moléculas pode desencadear efeitos mais rapidamente do que são neutralizadas pelos anticorpos.

Contrariamente, outros estudos sugerem que as outras moléculas do veneno são importantes para a letalidade do veneno. A vacinação com veneno total foi capaz de proteger 100% dos animais frente a 7.5 DL_{50} de veneno de *L. intermedia* (75 μ g/20 gramas) enquanto que a vacinação com uma FLD apresentou 50% de proteção frente ao mesmo desafio (ARAUJO *et al.*, 2003). Ainda, 50 μ g de veneno total foi capaz de induzir 100% de letalidade em camundongos em 48 horas, a mesma quantidade de LiRecDT1 só foi capaz de induzir 60% de letalidade neste tempo (RIBEIRO *et al.*, 2007). Esses estudos demonstram que outros componentes do veneno, além das FLDs, podem desencadear morte em camundongos ou até mesmo potencializarem a ação das FLDs.

A neutralização das atividades letais do veneno em camundongos incubando anticorpos produzidos em coelhos contra rMEPLox (peptídeo sintético com epítomos de diversas toxinas loxoscélicas) também não apresentou 100% de proteção frente aos efeitos letais. Neste estudo, proteções de 60% foram observadas frente a 2,5 DL_{50} em 72 horas.

De fato, o principal motivo que pode causar o óbito no loxoscelismo sistêmico é a falência renal aguda. Em camundongos, foi demonstrada uma atividade direta das FLDs sob estruturas renais de camundongos, sugerindo que essas moléculas são responsáveis pela falência renal aguda nesses animais, não sendo dependente de hemólise intravascular disseminada (LUCIANO *et al.*, 2004). Ainda, outro órgão importante acometido pelo veneno é o fígado. No entanto, estudos em ratos demonstram que as FLDs são responsáveis apenas em parte pelos danos hepáticos, sugerindo que outras moléculas também são importantes na hepatotoxicidade (CHRISTOFF *et al.*, 2008).

No presente estudo, a formulação vacinal testada em camundongos e coelhos continha apenas FLDs mutadas como antígenos, e ela mostrou efeitos protetivos frente ao loxoscelismo cutâneo e sistêmico. Essas FLDs, por estarem inativas, puderam ser utilizadas com antígenos em grandes quantidades, sem que os animais desenvolvessem reações indesejadas durante o protocolo de vacinação. Assim, os resultados apresentados neste trabalho mostram que o uso dessas enzimas recombinantes como antígenos é seguro e eficaz.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acidentes envolvendo o gênero *Loxosceles* são considerados um problema de saúde pública em diversos países e uma terapia definitiva ainda não foi estabelecida para o tratamento. No contexto do envenenamento, as fosfolipases-D demonstraram ser as moléculas mais relevantes por serem capazes de desenvolver a maioria dos sintomas típicos que ocorrem após a picada com aranhas desse gênero. Neste estudo, FLDs mutadas recombinantes de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foram obtidas com sucesso. Por meio de mutações sítio dirigidas essas moléculas perderam a capacidade de promover suas principais atividades, o que as colocou como alvos moleculares interessantes para o tratamento do loxoscelismo. Essas enzimas podem ser utilizadas para a produção de uma soroterapia de segunda geração, possivelmente diminuindo os custos com a obtenção do veneno loxoscélico e o sofrimento animal relatados durante a produção. Além disso a inatividade possibilita o uso dessas enzimas como antígenos em formulações vacinais seguras. A vacinação anti-loxoscélica poderia ser uma estratégia adotada em áreas endêmicas, ou até para pacientes não elegíveis para os tratamentos comuns disponíveis. Dessa forma, uma

vacina trivalente usando FLDs mutadas recombinantes como antígeno foi testada *in vivo*. A vacinação demonstrou grande capacidade de proteger animais frente ao loxoscelismo cutâneo (ensaio de dermonecrose em coelhos) e sistêmico (ensaio de letalidade em camundongos). Apesar de a vacina desencadear grandes proteções frente ao loxoscelismo, outras formulações poderiam ser testadas. Como por exemplo, o aumento da massa de FLDs, outros adjuvantes ou a inclusão de outras moléculas do veneno loxoscélico. Além disso, os resultados apresentados aqui comprovam que esses antígenos podem ser utilizados para testes da produção de um soro anti-loxoscélico, uma vez demonstraram ser seguros e eficazes.

REFERÊNCIAS

ADIGUN, R.; BASIT, H.; MURRAY, J. Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous). In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.

ALVARENGA, L. M. et al. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific... - PubMed - NCBI. **Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay.**, v. 42, n. 7, p. 725–731, dez. 2003.

ANDREUCCI, M. et al. The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice. **European Journal of Internal Medicine**, v. 39, p. 1–8, 1 abr. 2017.

APPEL, M. H. et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, fev. 2008.

ARAUJO, S. C. et al. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 41, n. 3, p. 261–267, 1 mar. 2003.

ATALAN, G. et al. Comparison of Systemic Effects of Midazolam, Ketamine, and Isoflurane Anaesthesia in Rabbits. **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 275–283, 12 jun. 2019.

ATKINS, J. A.; WINGO, C. W.; SODEMAN, W. A. Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest. **Science (New York, N.Y.)**, v. 126, n. 3263, p. 73, 12 jul. 1957.

BABCOCK. **Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) - ScienceDirect**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010181900040>>. Acesso em: 3 fev. 2020.

BARBARO, K. C. et al. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 30, n. 3, p. 331–338, mar. 1992.

BARBARO, K. C. et al. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 337–343, maio 1996.

BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, n. 1, p. 113–120, jan. 1994.

BENSON, K. G.; PAUL-MURPHY, J. Clinical Pathology of the Domestic Rabbit: Acquisition and Interpretation of Samples. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Clinical Pathology and Sample Collection. v. 2, n. 3, p. 539–551, 1 set. 1999.

BINFORD, G. J. et al. Molecular Evolution, Functional Variation, and Proposed Nomenclature of the Gene Family That Includes Sphingomyelinase D in Sicariid Spider Venoms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 3, p. 547–566, mar. 2009.

BOIA-FERREIRA, M. et al. TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. **Cells**, v. 8, n. 12, 22 nov. 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.

BUCARETCHI, F. et al. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*. **Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 48, n. 7, p. 764–765, ago. 2010.

BUCH, D. R. et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. **Toxicon**, v. 108, p. 154–166, 15 dez. 2015.

CHAIM, O. M. et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 64–77, 15 fev. 2006.

CHAIM, O. M. et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1811, n. 2, p. 84–96, fev. 2011.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 655–666, 1 jul. 2009.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2529–2540, set. 2011.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, 8 fev. 2017.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotoools for the Development of Novel Therapeutics. **Toxins**, v. 11, n. 6, 19 jun. 2019.

Clinical Biochemistry of Domestic Animals. [s.l.] Elsevier, 1997.

CORONADO, M. A. et al. **Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D**. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/131034/article>>. Acesso em: 22 dez. 2019.

CORRÊA, M. A. et al. Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* Venom Induces the Expression of MMP7 in Human Keratinocytes: Contribution to Dermonecrosis. **PloS One**, v. 11, n. 4, p. e0153090, 2016.

DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 1 dez. 2004.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241–1253, set. 2006.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289–300, mar. 2007a.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The Biochemical Journal**, v. 406, n. 2, p. 355–363, 1 set. 2007b.

DANTAS, A. E. et al. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 120, p. 97–106, 15 set. 2016.

DE ALMEIDA, D. M. et al. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 463–470, set. 2008.

DE GIUSEPPE, P. O. et al. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, n. 4, p. 622–627, 17 jun. 2011.

DE GREGORIO, E.; CAPRONI, E.; ULMER, J. B. Vaccine adjuvants: mode of action. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 214, 2013.

DE MOURA, J. et al. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29, n. 45, p. 7992–8001, 19 out. 2011.

DE OLIVEIRA CHRISTOFF, A. et al. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 695–704, nov. 2008.

DE OLIVEIRA, K. C. et al. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 4, p. 421–429, 15 mar. 2005.

DE SOUZA, A. L. et al. Loxosceles venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 51, n. 1, p. 151–156, jan. 2008.

DIAS-LOPES, C. et al. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of Loxosceles intermedia venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 481–487, 1 fev. 2010.

DIAS-LOPES, C. et al. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from Loxosceles spider venoms. **Vaccine**, v. 32, n. 18, p. 2086–2092, 11 abr. 2014.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Protocolo Clínico Acidente Aranha Loxosceles**. Disponível em:

<<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/agrivos/publicacoes/ProtocoloClinicoAcidenteAranhaLoxosceles2014.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

DOMINGOS, M. O. et al. Effect of Loxosceles gaucho venom on cell morphology and behaviour in vitro in the presence and absence of sphingomyelin. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 439–445, 1 set. 2003.

DUNBAR, J. P.; SULPICE, R.; DUGON, M. M. The kiss of (cell) death: can venom-induced immune response contribute to dermal necrosis following arthropod envenomations? **Clinical Toxicology**, v. 57, n. 8, p. 677–685, 3 ago. 2019.

EL HAFNY, B. et al. Intraspecific variability and pharmacokinetic characteristics of Androctonus mauretanicus mauretanicus scorpion venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 11, p. 1609–1616, nov. 2002.

Exotic Animal Formulary. [s.l.] Elsevier, 2018.

FEITOSA, L. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (Loxosceles intermedia) venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 7, p. 1039–1051, jul. 1998.

FELICORI, L. et al. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from Loxosceles intermedia spider. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 509–519, 1 out. 2006.

FELICORI, L. et al. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from Loxosceles intermedia spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4201–4208, 24 jun. 2009.

FERNANDES PEDROSA, M. DE F. et al. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from Loxosceles laeta venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 638–645, 15 nov. 2002.

FERNANDES-PEDROSA, M. DE F. et al. Transcriptome analysis of Loxosceles laeta (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC genomics**, v. 9, p. 279, 12 jun. 2008.

FERRER, V. P. et al. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2206, 2013.

FIGUEIREDO, L. F. M. et al. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 86, p. 59–67, ago. 2014.

FISCHER, M. L. et al. Sound is involved in multimodal communication of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae; Sicariidae). **Behavioural Processes**, v. 82, n. 3, p. 236–243, nov. 2009.

FORRESTER, L. J.; BARRETT, J. T.; CAMPBELL, B. J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: The role of sphingomyelinase D. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 355–365, 30 abr. 1978.

FRANÇA, F. O. DE S.; BARBARO, K. C.; ABDULKADER, R. C. R. DE M. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 287–290, jun. 2002.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261–267, out. 1992.

GIL, A. G.; SILVÁN, G.; ILLERA, J. C. Pituitary–adrenocortical axis, serum serotonin and biochemical response after halothane or isoflurane anaesthesia in rabbits. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 4, p. 411–419, out. 2007.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 425–426, jun. 2003.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular bioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403–2416, dez. 2010.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 83, p. 91–120, jun. 2014.

GREMSKI, L. H. et al. Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. **Toxins**, v. 12, n. 3, p. 164, mar. 2020.

GUIMARÃES, G. et al. Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 70, p. 90–97, ago. 2013.

HANNUN, Y. A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 5, p. 3125–3128, 4 fev. 1994.

HARCOURT-BROWN, F. Radiographic signs of renal disease in rabbits. **Veterinary Record**, v. 160, n. 23, p. 787–794, 9 jun. 2007.

HARCOURT-BROWN, F. M. Diagnosis of Renal Disease in Rabbits. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 145–174, jan. 2013.

HARLOW, E.; LANE, D.; LANE, E. H. D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. [s.l.] CSHL Press, 1988.

HEIN, J.; HARTMANN, K. Reference ranges for laboratory parameters in rabbits. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere**, v. 31, p. 321–328, 1 jan. 2003.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, v. 44, n. 6, p. 608–624, dez. 2004.

HORTA, C. C. R. et al. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with loxosceles spider venom. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1682–1685, jun. 2013.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet (London, England)**, v. 378, n. 9808, p. 2039–2047, 10 dez. 2011.

KALAPOTHAKIS, E. et al. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of Loxosceles intermedia spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691–1699, 1 dez. 2002.

KONDAKOVA, O. A. et al. Vaccines against anthrax based on recombinant protective antigen: problems and solutions. **Expert Review of Vaccines**, v. 18, n. 8, p. 813–828, ago. 2019.

KORN, A. K. et al. An update on clinical biochemical RIs of rabbits with special consideration for age, gender, and size. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 2, p. 233–245, jun. 2018.

KURPIEWSKI, G. et al. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of Loxosceles reclusa. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 678, n. 3, p. 467–476, 18 dez. 1981.

KUSMA, J. et al. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11–12, p. 1722–1736, dez. 2008.

LAJOIE, D. M. et al. Variable Substrate Preference among Phospholipase D Toxins from Sicariid Spiders. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 17, p. 10994–11007, 24 abr. 2015.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **The Biochemical Journal**, v. 391, n. Pt 2, p. 317–323, 15 out. 2005.

LIMA, S. DE A. et al. Recombinant Protein Containing B-Cell Epitopes of Different *Loxosceles* Spider Toxins Generates Neutralizing Antibodies in Immunized Rabbits. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018a.

LIMA, S. DE A. et al. Recombinant Protein Containing B-Cell Epitopes of Different *Loxosceles* Spider Toxins Generates Neutralizing Antibodies in Immunized Rabbits. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 3 abr. 2018b.

LOVRECEK, D.; TOMIĆ, S. A century of antivenom. **Collegium Antropologicum**, v. 35, n. 1, p. 249–258, mar. 2011.

LUCIANO, M. N. et al. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 52, n. 4, p. 455–467, abr. 2004.

LUNG, J. M.; MALLORY, S. B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 4, p. 287–289, abr. 2000.

MACHADO, L. F. et al. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 2167–2176, maio 2005.

MAGALHÃES, G. S. et al. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1773–1783, 1 set. 2013.

MÁLAQUE, C. M. S. et al. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139–143, jun. 2002.

Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação. p. 178, [s.d.].

MARQUES-DA-SILVA, E. **Loxoscelismo no estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1832, no período de 1993 a 2000.** [s.l.: s.n.].

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. [*Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Paraná]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 331–335, ago. 2005.

MASOOD, R. et al. Spider's venom phospholipases D: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1054–1065, fev. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TabNet Win32 3.0: ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de**

Agravos de Notificação - Brasil. Disponível em:

<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRAZIL). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, Vaccines Educational Supplement. v. 28, p. C2–C13, 31 ago. 2010.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural Basis for Metal Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13658–13664, 4 ago. 2005.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 323–329, 31 mar. 2006.

NABEL, G. J. Designing tomorrow's vaccines. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 551–560, 7 fev. 2013.

NGUYEN, N.; PANDEY, M. Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations. **Advances in Hematology**, v. 2019, p. 4091278, 2019.

OLVERA, A. et al. North and South American Loxosceles spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 1, p. 64–74, jul. 2006.

OSPEDAL, K. Z. et al. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, n. 6, p. 287–294, dez. 2002.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by loxosceles venom sphingomyelinase D. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 61–68, jan. 2006.

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311–320, 15 jan. 2015.

PAULI, I. et al. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 2, p. 123–137, ago. 2006.

PAULI, I. et al. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (Loxosceles intermedia). **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 6, p. 660–671, maio 2009.

PERNET, C. et al. [Necrotic arachnidism in the south of France: two clinical cases of loxoscelism]. **Annales De Dermatologie Et De Venereologie**, v. 137, n. 12, p. 808–812, dez. 2010.

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n. 4, p. 191–193, nov. 2006.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, dez. 2013.

RIBEIRO, L. A. et al. **Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero Loxosceles Heinecken. Lowe no Estado do Paraná (Brasil)**. [s.l: s.n.].

RIBEIRO, R. O. S. et al. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 8, p. 1162–1174, 15 dez. 2007.

RIMANIOL, A.-C. et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. **Vaccine**, v. 22, n. 23–24, p. 3127–3135, 13 ago. 2004.

SAUPE, E. E. et al. Tracking a medically important spider: climate change, ecological niche modeling, and the brown recluse (*Loxosceles reclusa*). **PloS One**, v. 6, n. 3, p. e17731, 25 mar. 2011.

SCHENONE, H. [Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrodectism and loxoscelism]. **Revista Medica De Chile**, v. 131, n. 4, p. 437–444, abr. 2003.

SENFF-RIBEIRO, A. et al. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 210–218, jun. 2008.

SEZERINO, U. M. et al. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 5, p. 546–548, out. 1998.

STOCK, R. P. et al. Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e36003, 2012.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 213–221, jun. 2006a.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 213–221, jun. 2006b.

Systemic Pathological Alterations Caused by Philodryas Patagoniensis Colubrid Snake Venom in Rats - PubMed. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16911815/>>. Acesso em: 3 fev. 2020.

TAMBOURGI, D. V. et al. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent

hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 1, p. 366–373, 9 out. 1998.

TAMBOURGI, D. V. et al. Loxosceles intermedia spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683–691, 15 jan. 2000.

TANDRUP SCHMIDT, S. et al. Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 1, 10 mar. 2016.

TAVARES, F. L. et al. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by Loxosceles gaucho spider venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 477–486, out. 2004.

The Biology of the Laboratory Rabbit. [s.l.] Elsevier, 1974.

TREVISAN-SILVA, D. et al. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus Loxosceles). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21–32, jan. 2010.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Recombinant Protein–Based Dengue Vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

VANDEN BERGHE, T. et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 135–147, fev. 2014.

VEIGA, S. S. et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, n. 6, p. 825–839, jun. 2000a.

VEIGA, S. S. et al. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **The Histochemical Journal**, v. 32, n. 7, p. 397–408, jul. 2000b.

VUITIKA, L. et al. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: identification and functional characterization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 11, p. 2479–2492, nov. 2013.

VUITIKA, L. et al. Active site mapping of Loxosceles phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 9, Part A, p. 970–979, 1 set. 2016.

WEN, Y.; SHI, Y. Alum: an old dog with new tricks. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, p. e25, 23 mar. 2016.

WENDELL, R. P. Brown recluse spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. **Southern Medical Journal**, v. 96, n. 5, p. 486–490, maio 2003.

WORLD SPIDER CATALOG. Natural History Museum Bern, , [s.d.].

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 39, n. 2–3, p. 391–400, mar. 2001.

ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1205

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.046052/2018-91

APROVADO/APPROVAL: 18/09/2018 – R.O. 08/2018

TÍTULO: Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* utilizando fosfolipases D mutadas recombinantes como antígeno.

TITLE: Protection against the toxic effects of *Loxosceles* spider venom using mutated recombinant phospholipases D as antigens.

AUTORES/AUTHORS: Luiza Helena Gremski, Nyanne Louise Costacurta Polli, Larissa Vuitika, Bruno César Antunes, Hanna Câmara da Justa, Pedro Henrique Schluga, Kamila Moreno.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular

Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA

ANEXO 2 – ARTIGO



Review

Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D

Luiza Helena Gremski ¹, Hanna Câmara da Justa ¹, Thaís Pereira da Silva ¹,
Nayanne Louise Costacurta Polli ¹, Bruno César Antunes ^{1,2}, João Carlos Minozzo ²,
Ana Carolina Martins Wille ³, Andrea Senff-Ribeiro ¹ , Raghuvir Krishnaswamy Arni ⁴ and
Silvio Sanches Veiga ^{1,*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba 81531-980, PR, Brazil; luizagremski@ufpr.br (L.H.G.); hannajusta@gmail.com (H.C.d.J.); thaiscwb@yahoo.com.br (T.P.d.S.); nayannepolli@gmail.com (N.L.C.P.); brunocesarantunes@hotmail.com (B.C.A.); senffribeiro@gmail.com (A.S.-R.)

² Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara 83302-200, PR, Brazil; jminozzo@yahoo.com.br

³ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa 84030-900, PR, Brazil; anacarolina.wille@yahoo.com.br

⁴ Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, SP, Brazil; raghuvir.arni@unesp.br

* Correspondence: veigass@ufpr.br; Tel.: +55-(41)-3361-1776

Received: 12 February 2020; Accepted: 2 March 2020; Published: 6 March 2020



Abstract: Spiders of the genus *Loxosceles*, popularly known as Brown spiders, are considered a serious public health issue, especially in regions of hot or temperate climates, such as parts of North and South America. Although the venoms of these arachnids are complex in molecular composition, often containing proteins with distinct biochemical characteristics, the literature has primarily described a family of toxins, the Phospholipases-D (PLDs), which are highly conserved in all *Loxosceles* species. PLDs trigger most of the major clinical symptoms of loxoscelism i.e., dermonecrosis, thrombocytopenia, hemolysis, and acute renal failure. The key role played by PLDs in the symptomatology of loxoscelism was first described 40 years ago, when researches purified a hemolytic toxin that cleaved sphingomyelin and generated choline, and was referred to as a Sphingomyelinase-D, which was subsequently changed to Phospholipase-D when it was demonstrated that the enzyme also cleaved other cellular phospholipids. In this review, we present the information gleaned over the last 40 years about PLDs from *Loxosceles* venoms especially with regard to the production and characterization of recombinant isoforms. The history of obtaining these toxins is discussed, as well as their molecular organization and mechanisms of interaction with their substrates. We will address cellular biology aspects of these toxins and how they can be used in the development of drugs to address inflammatory processes and loxoscelism. Present and future aspects of loxoscelism diagnosis will be discussed, as well as their biotechnological applications and actions expected for the future in this field.

Keywords: brown spider; venom; phospholipases-D; biochemical and biological activities

Key Contribution: The primary goal of this review is to celebrate 40 years of research of Brown spider Phospholipases-D by presenting an overview of the extensive research results related to these toxins, outlining the knowledge that has been gathered over the years and the prospects for advances in studies on these enzymes.

1. Molecular Characteristics of Brown Spider Venoms

Loxoscelism, the set of clinical manifestations of envenomation by Brown Spiders (*Loxosceles* genus), can be cutaneous and systemic. At the bite site, the cutaneous symptoms are edema, erythema and dermonecrosis with gravitational spreading of lesion (the characteristic hallmark of envenoming). The systemic condition, which is less common, may lead to death and includes hematological changes such as intravascular hemolysis, disseminated intravascular coagulation and thrombocytopenia, as well as acute renal failure [1–6]. The volume of venom injected at the time of the bite is low, normally just a few microliters and contains between 60 and 100 micrograms of protein [7]. *Loxosceles* spider venoms are colorless liquids, predominantly composed of proteins and peptides with molecular masses in the 5 to 45 kDa range [2,5]. The toxins encountered in Loxoscelic venoms can be separated into two major groups: (i) insecticidal toxins (Inhibitor Cystine Knot—ICK—peptides), metalloproteases (Astacins) and phospholipases-D (PLDs), and (ii) the toxins expressed in lower quantities such as; hyaluronidases, serine proteases, serine protease inhibitors (serpins), allergenic factors and a translationally controlled tumor protein (TCTP) [5,8]. The total venom composition was determined by transcriptome analyses of the *Loxosceles intermedia* venom gland [8]. The toxin-encoding transcripts quantitative profile of *L. intermedia* venom gland was 56% of Knottins, 23% of Astacins, 20% of PLDs and about 1% of the other toxins [8]. The study of *L. laeta* venom gland transcripts encoding PLDs showed that these toxins correspond to about 16% of all transcripts [9], although 16 clusters annotated as similar to sphingomyelinase D (PLDs) are in fact similar to *Loxosceles* ICK peptides (GenBank accession numbers EY189720, EY188468, EY188410, EY189491, EY189459, EY189456, EY188675, EY189643, EY189620, EY189608, EY188487, EY189575, EY188624, EY188618, EY188594, EY188592) and one similar to other neurotoxins (EY188603) when compared to GenBank sequences using the blastx algorithm (*E* values $< 1.00 \times 10^{-5}$). A similar study of transcripts encoding PLDs from *L. similis* venom glands showed that these toxins correspond to about 15% of the total produced transcripts. Transcript analysis revealed 12 main groups and a predominance of s1 and s11 isoforms, which together correspond to about 72% of transcripts for PLDs [10]. The high abundance of these isoforms is not surprising, since *L. similis* PLDs of s1 and s11 groups are highly similar to *L. intermedia* PLDs that comprise 69.7% of *L. intermedia* PLD transcripts. Interestingly, an antimicrobial peptide (1695.75 Da), recently identified in *L. gaucho* venom, presented a remarkable similarity to specific regions of phospholipases D from *Loxosceles* genus. This peptide, referred to as U1-SCRTX-Lg1a, possesses an antibacterial effect on gram-negative bacteria [11]. The authors suggested that U1-SCRTX-Lg1a may have originated by limited proteolysis of a venom PLD. Thus, it is possible that PLD rates evaluated by transcriptomic analyses may be overestimated.

Despite the complexity of the venom, both native and recombinant PLDs alone can reproduce virtually all the clinical symptoms of Loxoscelism. Although the PLDs are not the most expressed toxins in *Loxosceles* venoms, they are the best studied and characterized toxins. Figure 1 summarizes the main aspects and activities of Brown spider PLDs by displaying updated assays and analyses performed for this work. The SDS-PAGE profiles of *L. intermedia* venom and a recombinant PLD are shown in Figure 1B and reveal an enrichment of proteins in the region of 30 to 35 kDa when venom is analyzed and a single band near to 35 kDa when the recombinant PLD was assayed. When amino acid sequences of representative PLDs from different *Loxosceles* species are aligned (Figure 1C), it is possible to observe the conservation of the residues involved in catalyses, as well as the preserved position of cysteine residues. The cross-reactivity of recombinant PLDs with native toxins of whole venom is demonstrated by a positive reaction in ELISA (Figure 1D), which suggests the conservation of epitopes between native and recombinant PLDs. Various biological activities of recombinant PLDs were brought together by updated assays whose results are depicted in Figure 1E–H. Figure 1E illustrates the insecticidal activity of a recombinant *L. intermedia* PLD, which was already described for a recombinant PLD of *L. arizonica* [12]. Unlike animals of control group, insects that received recombinant PLD were paralyzed 15 min after exposition (turned upside down in images), and no recovery was observed. These crickets were dead within 24 h. The increase in vascular permeability and development of dermonecrosis by *Loxosceles* PLDs demonstrated before [13–16] were reinforced here by the results of the biological assays showed in Figure 1F,G. The massive inflammatory response, necrosis and interstitial edema found in the histological analyses of rabbit skin exposed to a *L. intermedia* PLD (Figure 1G

II–V) corroborate with those previous studies and agree with the histopathological changes triggered by the whole venom [17]. In addition, when the structures of the catalytic, flexible, and variable loops of *L. intermedia* and *L. laeta* PLDs are overlapped (Figure 1I), it is possible to observe that the main differences lies in the position of the flexible loop, since this *L. laeta* PLD naturally lacks the Cys53/Cys202 disulphide bridge, which is present in the *L. intermedia* PLD, as previously reported [18].

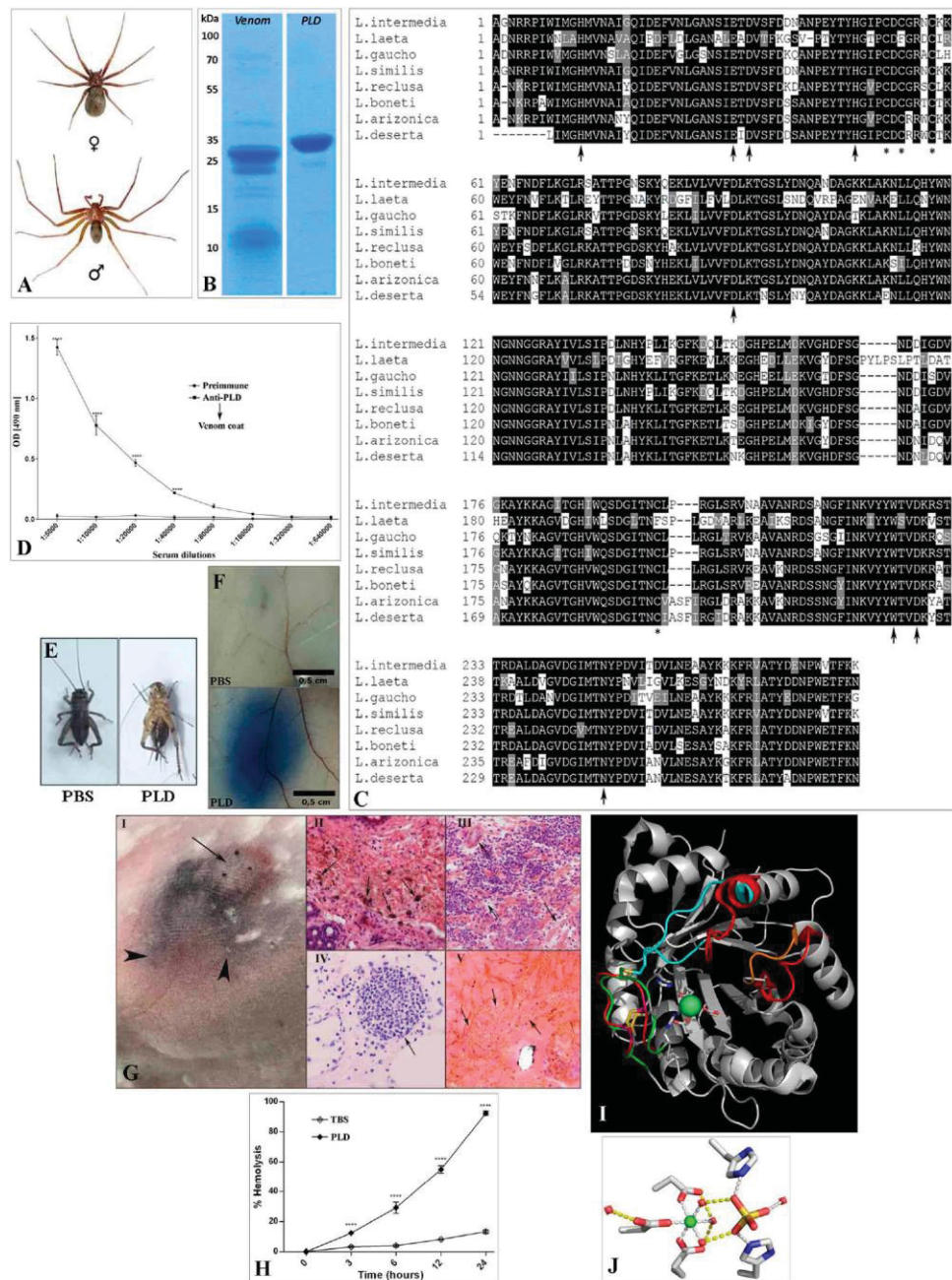


Figure 1. *Loxosceles* phospholipases-D: general aspects and biological activities. (A) Sexual dimorphism between female and male adult *L. intermedia* specimens. (B) SDS-PAGE under reduced conditions of *L. intermedia* venom (10 µg) and phospholipase-D (PLD) LiRecDT1 (5 µg). (C) Multiple sequence alignment of representative phospholipases-D of *L. intermedia* (GenBank accession number ABA62021), *L. laeta* (AY093599), *L. gaucho* (JX866729), *L. similis* (AAX78234), *L. reclusa* (AY862486), *L. boneti* (AY559844), *L. arizonica* (AY699703) and *L. deserta* (C0JAU5). Sequences were aligned using the CLUSTAL X2 program [19].

Amino acid identities are shaded in black. Conservative substitutions are in gray, arrows point to amino acid residues involved in catalysis. The asterisks indicate cysteine residues. (D) Reactivity against *L. intermedia* crude venom using different dilutions of anti-LiRecDT1 serum (Anti-PLD) accessed by ELISA. The average \pm standard errors are shown, with significance levels **** $p \leq 0.0001$ comparing pre-immune with anti-PLD sera. (E) Representative images of crickets ($n = 5$) treated with Phosphate Buffered Saline (PBS) or LiRecDT1 (*L. intermedia* PLD, 4 μ g) injected in the second segment of abdomen. (F) Increasing of vascular permeability of cutaneous blood vessels in mice triggered by LiRecDT1. (G) Dermonecrosis and histopathological changes following LiRecDT1 injection in rabbits' tissue. (I) 5 μ g of LiRecDT1 was injected subcutaneously in back skin. Arrow shows the site of injection and arrowheads show spreading of dermonecrotic lesion after 24 h. (II–V) Histopathological findings of rabbits' skin 24 h following LiRecDT1 exposure. (II) Arrows show necrotic sites; (III) massive inflammatory response into the dermis and disorganization of collagen fibers pointed by arrows; (IV) massive inflammatory cell accumulation within dermal blood vessels (arrow); (V) hemorrhagic sites into the dermis are pointed by arrows. (H) Time-dependent direct hemolysis activity in rabbit erythrocytes treated with Phospholipase D of *Loxosceles gaucho*. (I) Cartoon representation of the structures of Brown spider venom PLDs: structural features highlighted in green, cyan and orange (catalytic, flexible, and variable loops, respectively) are from *Loxosceles intermedia* (PDB code: 3RLH) and in red are from *Loxosceles laeta* (PDB code: 1XX1). Amino acids participating in binding to Mg^{2+} (green sphere), catalysis and disulfide bridge formation are included in atom colors. (J) Mg^{2+} coordination (green sphere) by amino acid side chains and solvent molecules. Bound sulfate ion (yellow, red) is included. All procedures involving animals were carried out in accordance with "Brazilian Federal Laws", following the Institutional Ethics Committee for Animal Studies Guidelines from Federal University of Paraná (Certificate n° 1112 of the Federal University of Paraná).

2. Nomenclatures and Biochemical Classification of Brown Spider PLDs

Since the main symptoms of accidents caused by spiders of the genus *Loxosceles* are skin lesions, with necrosis of the all envenomed tissue structures, Loxoscelism is also referred to as Cutaneous arachnidism or Gangrenous arachnidism [20]. The existence of a putative toxin involved in necrosis following accidents with spiders of the genus *Loxosceles* was initially postulated as Necrotic Toxin or Dermonecrotic Toxin [21,22]. Following the discovery in the venom of *Loxosceles reclusa* of a toxin capable of cleaving sphingomyelin, producing ceramide-phosphate and choline, involved with hemolytic activities and platelet aggregation, this molecule was then called Sphingomyelinase-D [23–25]. Over the next few years, the two terms *dermonecrotic toxin* and *sphingomyelinase-D* were used to designate the same molecules involved in some deleterious effects observed following envenomation by spiders of the genus *Loxosceles*.

In 2005, Machado et al. [26], using mass spectrometry and bi-dimensional electrophoresis, characterized 11 isoforms of toxins from venom of the South American species *L. gaucho* and since these toxins were involved in skin necrosis, the authors referred to it as Loxnecrogin. In the same year, Lee and Lynch [27], working with a recombinant toxin from the *Loxosceles reclusa* venom, showed that this toxin, besides cleaving sphingomyelin, was able to cleave other phospholipids such as lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylinositol, lysophosphatidylserine, lyso-PAF and cyclic phosphatidic acid. The authors argued that because of this broad phospholipase activity exhibited, the term sphingomyelinase-D was very limited, and proposed the term Phospholipase-D [27]. Further studies confirmed these data by showing that recombinant PLD toxins from *L. intermedia* venom cleave sphingomyelin, lysophosphatidylcholine, and lyso-PAF [28,29], and that a recombinant PLD toxin from *L. arizonica* venom presented activity on sphingomyelin, lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylethanolamine [30]. Since these enzymes from different species of *Loxosceles* have the ability to hydrolyze a wide range of different phospholipids, they are now classified as Phospholipases-D [5,30]. In an attempt to standardize the nomenclature of these toxins, a classification was proposed based on the amino acid sequence alignment of the various PLDs present in the *Loxosceles intermedia* venom deduced from cDNA sequences, phylogenetic studies and also on the biochemical and biological properties of these molecules. This study showed that, although all

toxins possess the signature of the catalytic site of PLDs, some did not display all the biochemical activities such as enzymatic activity on sphingomyelin, or dermonecrotic activities in rabbits. The authors suggested using the definition of the Loxtox Family, pointing out the existence of six distinct groups [31]. Based on similar parameters and on the classification of spiders of the genus *Loxosceles* as members of the Sicariidae Family, the broader term of SicTox was proposed to represent toxin members of Brown spider venoms [32–34]. Currently, although all attempts to classify homologues of the *Loxosceles* genus spider venom toxins with phospholipase-D activities or amino acid similarities are valid, what is usually employed are the nomenclatures based on the biochemical properties of these enzymes, which act by cutting a wide variety of phospholipids (Phospholipases-D or PLDs) or by preferentially cutting sphingomyelin among different phospholipids (Sphingomyelinases-D).

3. The History of PLDs in Loxoscelism and the Production of These Toxins as Recombinant Proteins

The first descriptions of the clinical signals of the accidents did not detect the presence of a sphingomyelinase-D. However, in the middle of the 20th century, Atkins et al [22]. suggested that the venom of *Loxosceles reclusa* contained a toxin with necrotic activity on different tissues. Subsequently, some studies were published showing hemolytic and cytotoxic activities of venom [35,36]. Histopathological analyzes of envenomed tissues samples indicated a crucial role of polymorphonuclear (PMN) leukocytes (segmented neutrophils) in the dermonecrotic lesion caused by the venom of *Loxosceles reclusa* [37]. Nevertheless, Majeski et al. [38] affirmed that the venom directly causes inactivation of leukocytes. These authors suggested that neutrophils moved to the lesion area due to the activation of complement sequence by the necrotic tissue, based on a previous study that characterized the venom as an inhibitor of the complement sequence [39]. A few decades later, using cell culture techniques, Patel et al. [40] showed that the activation of the PMN leukocytes, which participate in necrotizing activity during the envenomation, is due to an indirect activation caused by toxins of *L. reclusa* venom on endothelial cells of the blood vessels, which in turn, activate the PMN leukocytes.

The first biochemical data in the literature pointing out the existence of a toxin characterized as sphingomyelinase-D in venom of a *Loxosceles* spider was published in 1978. Forrester et al. [23] showed that a purified fraction of the venom of *L. reclusa*, capable of causing lysis of sheep and human erythrocytes, cleaved sphingomyelin, producing ceramide-phosphate and choline, thus being characterized as a Sphingomyelinase-D. Later, Kurpiewski et al. [24] purified a *L. reclusa* sphingomyelinase D, and showed that the platelet aggregation effect caused by the venom of *L. reclusa* was also dependent on sphingomyelinase-D activity. This effect was later shown to be dependent upon the presence of serum amyloid protein [25]. Sphingomyelinases D from the venoms of *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* were also purified in the following years and featured as dermonecrotic, hemolytic and lethal toxins [41–44]. With the exception of these few studies, the majority of investigations concerning the activities of sphingomyelinases D were carried out using crude venom of *Loxosceles* species until the beginning of the 21st century, when the first descriptions of production of these toxins in the recombinant form were made.

Many groups reported the production of the first recombinant toxins characterized as PLDs of *L. intermedia* [45] and *L. laeta* [46]. Lee and Lynch et al. [27] reported the recombinant expression of a PLD from *L. reclusa*. Other expressions of recombinant PLDs from the *Loxosceles* venoms characterized the existence of a family of isoforms/homologues of PLDs within the same venom (intra-species). For instance, to date, 8 PLD homologues from the *L. intermedia* venom have been expressed (Table 1), all containing the same amino acids involved in the catalysis, but varying in the primary structure of the proteins and in the biochemical and biological activities [13,14,16,45,47,48]. These data describing the existence of a family of PLD homologues within *Loxosceles* intra-species venom were confirmed by proteomic analysis and immunological assays using poly and monoclonal antibodies against a recombinant PLD, which recognized several proteins analyzed by bi-dimensional criteria (IEF and SDS-PAGE) [26,49,50]. Other recombinant PLDs from venoms of different *Loxosceles* species have been described in *L. laeta* [18,51,52], *L. reclusa* and *L. boneti* [51], *L. arizonica* [12,30] and *L. gaucho* [53]. They were all produced in prokaryotic expression systems with different tags. Table 1 describes these recombinant toxins and their main features.

Table 1. Recombinant *Loxosceles* phospholipases-D (PLDs) and their main activities.

Recombinant <i>Loxosceles</i> PLDs														
Species	Name	GenBank Accession Number	Dermonecrosis	Hemolysis	Sphingo-myelinase	In vitro Platelet Aggregation	Known Activity				References			
							Vasc. Perm. Increase	Inflammat.	Lethality	Nephrotox	Edema	Cardiotox	Insecticidal	
<i>L. intermedia</i>	LiRecDT1; LjSicTox-alphaA1a	ABA62021, POCES0	Yes	Yes (Direct/C-dep)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-	Yes	[9,47,53,54]: This work
	LiD1	AAQ16123	Yes	Yes (C-dep)	Yes	Yes	-	-	-	-	Yes	Yes	-	[45,55-57]
	LiRecDT2; LjSicTox-alphaA2aII	ABB69098, POCES3	Yes	Yes (Direct)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-	Yes	-	-	[13,15,54]
	LiRecDT3	ABE71184	No	No	No	No	No	±	No	-	No	-	-	[13,15]
	LiRecDT4	ABD91846	Yes	-	Yes	±	Yes	Yes	-	-	Yes	-	-	[14]
	LiRecDT5	ABD91847	No	-	No	No	No	±	-	-	Yes	-	-	[14]
	LiRecDT6	ABO87656	Yes	-	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-	Yes	-	-	[48]
<i>L. lacta</i>	LiRecDT7	AGN52903	Yes	Yes (Direct)	Yes	-	Yes	Yes	-	-	-	-	-	[16]
	Smase I/ LjSicTox-alphaIIII	AAM21154	Yes	Yes (C-dep)	Yes	-	-	Yes	-	-	Yes	-	-	[18,46]
	LI1/LjSicTox-alphaIIIIII	ABD15447	-	-	Yes	-	-	-	Yes	-	-	-	-	[51]
	LIPLD1	ADP00408	-	Yes (C-dep)	Yes	-	-	Yes	-	-	-	-	-	[52,58]
	LIPLD2	ADP00409	-	No	No	-	-	Yes	-	-	-	-	-	[52,58]
	LI2/LjSicTox-alphaII2	ABD15448	-	-	Yes	-	-	-	Yes	-	-	-	-	[51]
	Smase II/ LjSicTox-betaIa1	AAM21156	±	Yes (C-dep)	Yes	-	-	Yes	-	-	Yes	-	-	[18,46]
<i>L. reclusa</i>	Smase D	AAW56831	-	Yes (C-dep)	Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	[27]
	Lr1	AAT66075	-	-	Yes	-	-	-	Yes	-	-	-	-	[51]
<i>L. boneti</i>	Lb1	AAT66073	-	-	Yes	-	-	-	Yes	-	-	-	-	[51]
	Lb3	AAT66074	-	-	No	-	-	-	-	-	-	-	-	[51]
<i>L. arizonica</i>	LarSicTox-alphaII2bi	Q4ZFU2	-	-	Yes	-	-	-	-	-	-	-	Yes	[12]
	LarSicTox-betaID1	AJV88487	-	-	Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	[30]
<i>L. gaucho</i>	LgRec1	AFY98967	Yes	Yes (Direct)	Yes	Yes	-	-	-	-	Yes	-	-	[53]

4. Studies with *Loxosceles* Venom PLDs Proved Their Participation in the Physiopathology of Envenoming

The participation of PLDs of Brown spider venoms in the physiopathology of Loxoscelism is well-defined, and was strengthened with the advent of recombinant forms of PLDs obtained from different species of spiders. As outlined in Table 1, the majority of recombinant *Loxosceles* PLDs possess in vitro sphingomyelinase activity, except for LiRecDT3 (*L. intermedia*), LiRecDT5 (*L. intermedia*), LIPLD2 (*L. laeta*) and Lb3 (*L. boneti*). LiRecDT3 and LiRecDT5 isoforms do not induce dermonecrosis and platelet aggregation. In addition, LiRecDT3 do not cause mouse mortality, have small edematogenic activity and low antigenic potential. LIPLD2 and LiRecDT3 have low hemolytic activity [14,15,51,52], although LIPLD2 was expressed without the His 12 residue, which was shown essential for the catalytic activity of these enzymes. LiRecDT3, LiRecDT5 and Lb3, however, maintain the amino acids involved in catalysis, but have some important variations in residues neighboring the catalytic site, which could explain the lack of enzymatic activity, as hypothesized earlier [14,15,51,52]. Figure 2 depicts the alignment of these three enzymes that do not have sphingomyelinase activity and active PLDs of the same species (i.e., *L. intermedia* and *L. boneti*). It is possible to observe the conservation of amino acids involved in catalysis in all sequences, but also many non-conservative substitutions among active and inactive PLDs. The amino acids in active enzymes that are replaced by amino acids with different side chains in inactive isoforms are pointed out in the Figure.

All the recombinant PLDs that possess in vitro sphingomyelinase activity, from different *Loxosceles* species, are able to trigger the main symptoms observed following envenoming by *Loxosceles* venoms. For instance, we can list local symptoms such as the development of dermonecrosis, massive inflammatory infiltrate, increase in vascular permeability, and edema. In addition, systemic disturbances, such as hemolysis, platelet aggregation and nephrotoxicity are also reported after exposure to recombinant PLD. A variant isoform of LiRecDT1 containing a single H12A mutation at the enzyme catalytic site lacks enzymatic activity and is only able to trigger a residual inflammatory response. This outcome is most likely due to this substitution, which directly impairs the catalytic activity. Other interesting data showed that this mutated PLD with the H12A substitution did not cause dermonecrosis in the skin of rabbits nor direct hemolysis in human erythrocytes [28].

Different PLDs from *L. intermedia* and *L. gaucho* induce platelet aggregation in platelet rich plasma, and this activity also appears to depend on their enzymatic activity [13,14,48,53]. Direct and complement (C)-dependent hemolysis are also functional activities of *Loxosceles* PLDs. Isoforms 1 and 2 of *L. intermedia* PLDs (Loxtox groups 1 and 2) can induce direct hemolysis [13] and complement dependent hemolysis [54]. *L. gaucho* PLD similarly trigger direct hemolysis [53]. C-dependent hemolysis is also induced by SmaseD from *L. reclusa* [27] and by Smase I, LIPLD1 (similarity of 96% between Smase I and LIPLD1) and Smase II, all recombinant PLDs of *L. laeta* [18,46,52]. Some authors that report C-dependent hemolysis relate this activity to the removal of glycoproteins by endogenous metalloproteinases activated by sphingomyelinase activity of PLDs and, thus, facilitating complement activation and hemolysis [18,54]. Direct hemolysis is also dependent on the bioactive products generated by the metabolism of membrane phospholipids after enzymatic activity [29,55]. It is important to mention that kidney injury caused by *Loxosceles* venom might be related to hemolysis. However, involvement of PLDs from Brown spider venoms in renal injury was brilliantly demonstrated by the use of wild-type PLD (LiRecDT1) and the mutated isoform with a substitution in the catalytic domain (LiRecDT1H12A). Treatments of mice with LiRecDT1, but not with the mutated toxin, evoked histological changes in the glomeruli and renal tubules of treated animals, increased blood urea and proteinuria, and caused animal lethality [59].

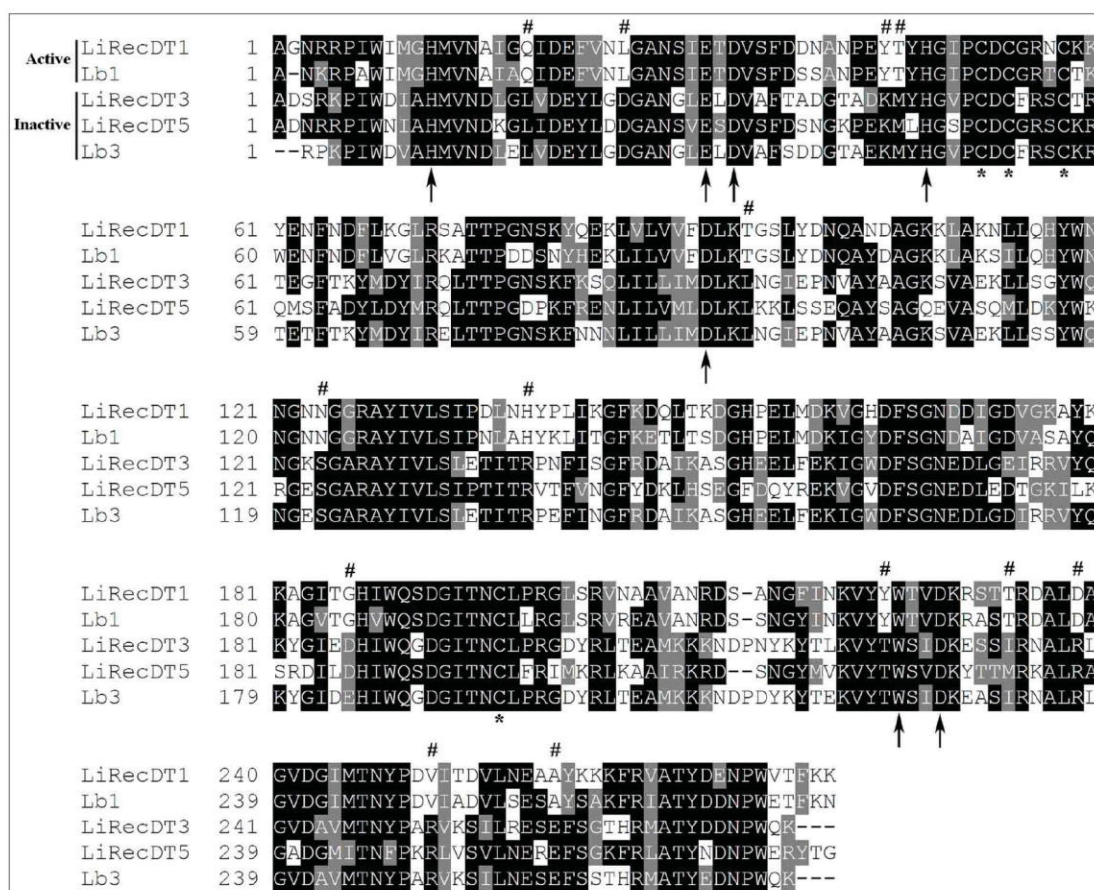


Figure 2. Enzymatically active and inactive Brown spider venom PLDs. Multiple sequence alignment of phospholipases-D of *Loxosceles intermedia* (Li) and *L. boneti* (Lb) venoms: LiRecDT1 (GenBank accession number ABA62021), Lb1 (AY559844)—active PLDs; LiRecDT3 (ABB71184), LiRecDT5 (ABD91847) and Lb3 (AAT66074)—inactive PLDs. Sequences were aligned using the CLUSTAL X2 program [19]. Amino acid identities are shaded in black. Conservative substitutions are in gray, arrows point to amino acid residues involved in catalysis. The asterisks show cysteine residues. Hashtags indicate amino acids in active enzymes that are replaced by amino acids with different side chains in inactive isoforms.

The role of Brown spider venom PLDs in the pathophysiology of envenomation was indirectly shown by the neutralization of the lethality of venom preparations in mice, using an antiserum produced with recombinant PLDs. The polyclonal sera were obtained by the inoculation of PLD recombinant isoforms from *L. laeta*, *L. reclusa* and *L. boneti* venoms in rabbits and horses [51]. A rabbit antiserum, produced with a recombinant PLD of *L. laeta*, significantly reduced the dermonecrotic lesion in rabbits challenged with the venom preincubated with serum [46]. More recently, Oliveira et al. [60] showed that mice serum produced against a recombinant PLD of *L. intermedia* inhibited dermonecrosis, hemorrhage and edema in rabbits challenged with the same toxin preincubated with serum.

Finally, using constructs with site-directed mutations, several homologous of recombinant forms of PLD toxins from *L. intermedia* venom were studied. The data not only confirmed the participation of PLDs in the pathological picture of the envenomation, reproducing dermonecrosis, hemolysis and increased capillary permeability, but also indicated the role of several specific amino acid residues in the catalytic mechanism responsible for the development of these effects [61]. In summary, it is safe to say that the data described in the literature are quite strong and prove the participation of *Loxosceles* venom PLDs as molecules involved in the dermonecrotic, inflammatory, hemolytic, nephrotoxic and thrombocytopenic effects described in the injured patients.

5. Structural Organization and the Catalytic Mechanisms of Brown Spider PLDs

The *Loxosceles* venom PLDs are impressive molecules, considering their biochemical and biological activities [2,5]. These enzymes cleave phospholipids in the bond between the phosphate and the hydrophilic moieties. Activities of PLDs have been described on various phospholipids in biological membranes, such as sphingomyelin, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylinositol, cyclic phosphatidic acid, lyso-PAF, among others examples [27,29,30]. Undoubtedly, the great development regarding structure and mechanism of PLDs from *Loxosceles* genus spiders has been obtained with the production of these enzymes in the recombinant form. Different PLDs from *Loxosceles laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* have been crystallized and their three-dimensional structures have been determined at high-resolution and combined with in silico analysis, docking and molecular dynamics we now have a better understanding of the precise steps involved in the catalytic mechanism of these enzymes. These PLDs contain between 284 and 285 amino acid residues, and are organized as a barrel formed by 8 parallel beta strands linked to alpha helices, resulting in a general fold referred to as $(\alpha/\beta)_8$ or a Triose Phosphate Isomerase (TIM) barrel. PLDs share structural homology with TIM, an enzyme with a similar three-dimensional fold [5,62–65]. The amino acid residues involved in the catalytic activity of these PLDs (His12, Glu32, Asp34, Asp91, His47, Asp52, Trp230, Asp233, and Asn252) [62] are well conserved in all isoforms of *Loxosceles* PLDs identified to date [5,61]. Structural analysis based on the crystal structures and molecular dynamics, showed that His12 and His47 residues are directly involved in the catalytic activity of PLDs [18,62,66]. His47 functions as the nucleophile initially acting on the phosphodiester linkage to release choline and His12 participates in the formation of ceramide-1-phosphate, which is the final product generated by the action of the PLDs on sphingomyelin [62]. The residues of the amino acids glutamic acid (Glu) 32, aspartic acid (Asp) 34 and 91 are involved in the coordination of a Magnesium ion (Mg^{2+}). In addition, Mg^{2+} plays an important role in the recognition and binding of lipid substrates cleaved by PLDs, and also plays a role in the stabilization of the enzyme-substrate complex [5,62,65]. Although sphingomyelins and lysophosphatidylcholines have been shown to be the preferred substrates for PLDs, the precise steps in the interaction with lipids is still not completely understood. Several reports argue that the *Loxosceles* venom PLDs display hydrolytic activity on their lipid substrates and cleave the phosphodiester bond in phospholipids, generating ceramide-1-phosphate when sphingomyelins are hydrolysed and lysophosphatidic acid when lysophosphatidylcholine is hydrolysed [2,5,27,65]. However, as previously shown for several other non-loxoscelic PLDs, these enzymes can mediate transphosphatidyl transfer reactions. Nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) data demonstrate that these enzymes generate cyclic lipids by transphosphatidyl transfer of its phospholipid substrates, producing cyclic ceramide-1-phosphate when acting on sphingomyelins, and cyclic phosphatidic acid when acting on lysophosphatidylcholines [67]. This new model requires a new interpretation in the molecular mechanisms of these enzymes [30]. According to Lajoie et al. [30], this mechanism could be similar to the bacterial enzyme GDPD (glycerophosphoryl phosphodiesterase), which also generates cyclic lipids following its catalytic action on phospholipids. In this model, the residues of amino acids H12 and H47, which are conserved in all loxoscelic PLDs described so far, would play an important role in catalysis. These authors also propose another molecular model for the mechanism of *Loxosceles* PLDs (based on molecular dynamics and docking models), in which there are some differences in the orientation of phosphoglycerol groups from the GDPD model. In this model, called “Reverse Orientation Model”, the hydrophilic part of the phospholipids (the polar head) would be oriented into the binding pocket of the PLD, where H47 would act as a nucleophilic group, whereas H12 could protonate the cleaved polar group. The Mg^{2+} ion would act by accelerating the catalytic reaction resulting in the stabilization of negative charges generated in the system. The structures of recombinant PLD isoforms containing mutations H12A [28,49,59] and H12A-H47A, D34A-E52A [61] confirmed the crystallographic data and indicated the role of these amino acids in the catalytic activity of these enzymes. In addition, the Y228A isoform of PLD of *L. Intermedia*, resulted in the wild-type active form turning into an isoform with only residual activity for both the catalysis of sphingomyelin and

for biological effects such as hemolysis and dermonecrosis [61]. Interestingly and corroborating this hypothesis, the inactive isoforms of PLDs LiRecDT3 and LiRecDT5, from *L. intermedia*, and Lb3, from *L. boneti*, present a modification in this region Y229T (Figure 2) [13–15,51]. These PLDs display only residual activities for dermonecrosis (*L. intermedia* isoforms) and catalysis (all isoforms). Another experimental data that strengthens the importance of the aromatic triple region (Y228–Y229–W230) in the *Loxosceles* venom PLDs was demonstrated by substitution of tryptophan (W230A), which resulted in an enzyme that neither degraded sphingomyelin nor possessed hemolytic activity [68]. This same study showed that the mutation D259G (corresponding to D233 when numbering excludes amino acids from the signal peptide) produced loss of activity upon sphingomyelin, and mutation S262A (corresponding to S236) caused a decrease in the enzymatic activity upon the same substrate.

In addition, mutant versions of the enzyme supported the understanding of the binding to their lipid substrates, especially with choline-containing phospholipids, such as sphingomyelin and lysophosphatidylcholine. In this sense, the region containing three aromatic amino acid residues Y228, Y229, and W230, which are conserved in all the isoforms of *Loxosceles* venom PLDs with high catalytic and biological activities, has been postulated as playing an important role in the binding and orientation of the substrate relative to the catalytic site [6]. The explanation for such a change in these activities would be that, in the wild-type form, the region rich in aromatic residues (Y228, Y229, and W230) would interact with the hydrophilic head of the substrates by cation- π bonds, with emphasis on the choline, as previously shown for other PLDs [69,70].

Analyses of the three-dimensional structures of these PLDs show a similar spatial organization containing three conserved regions, which were denominated catalytic, flexible and variable regions. The presence of one or two disulfide bonds formed by the cysteine residues (Cys51–Cys57 and Cys53–Cys201) stabilizes the catalytic site and controls the size of the catalytic cleft of *Loxosceles* PLDs [62]. According to this organization, it was suggested a classification of these enzymes in Class I, for those PLDs containing only one disulfide bridge maintained by the residues (Cys51 and Cys57), and Class II, for those PLDs containing the two disulfide bridges [63]. Experiments using a recombinant isoform with mutations in the second disulfide bridge (Cys53A–Cys201A) of a Class II PLD show that the variant obtained has its catalytic and biological activities reduced, but not blocked [61]. However, the presence or absence of the disulfide bridge between Cys53 and Cys201 is not by itself a feature that defines the enzymatic performance of a *Loxosceles* PLD. As shown in Figure 3, most *L. laeta* isoforms belongs to Class I, but Smase II possess the four cysteine residues that form the two disulfide bonds, being then classified as a Class II PLD. As described in Table 1, all the recombinant *L. laeta* PLDs are enzymatically active, except for LIPLD2 that lacks one histidine of the catalytic site.

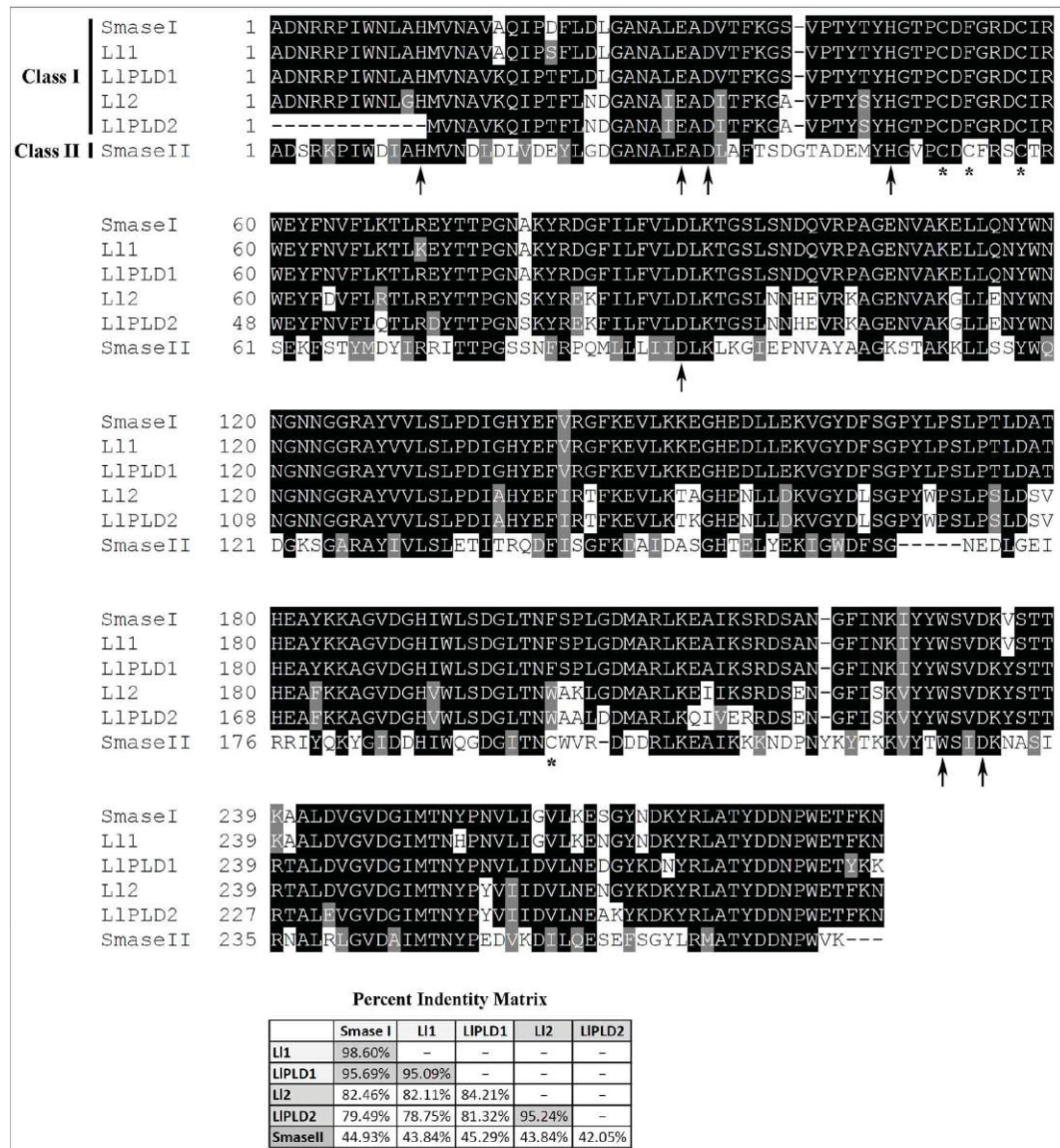


Figure 3. *Loxosceles laeta* Class I and II recombinant PLDs (A) Multiple sequence alignment of *L. laeta* class I phospholipases-D Smase I /L1SicTox-alphaIIIi (GenBank accession number AY093599), L11/L1SicTox-alphaIIIi (DQ369999), L1PLD1 (GU121905), L1PLD2 (GU121906), L12/L1SicTox-alphaIII2 (DQ370000) and class II Smase II/L1SicTox-betaIA1 (AY093601). Sequences were aligned using the CLUSTAL X2 program [19]. Amino acid identities are shaded in black. Conservative substitutions are in gray, arrows point to amino acid residues involved in catalysis. The asterisks show cysteine residues. (B) Percent identity matrix showing the similarities among aligned PLDs. Values given by CLUSTAL X2 program [19].

6. Proteomic Analysis in the Learning about Brown Spider Venom PLDs

Proteomic studies participated in the description of advances in learning about *Loxosceles* PLDs. The first proteomic analysis of a Brown spider venom was performed by Cunha et al. [71], who studied the venom of *Loxosceles gaucho* by means of liquid capillary chromatography and mass spectrometry. This work identified two toxins with approximately 31.4 and 31.6 kDa belonging to the sphingomyelinase-D family. In this same year, Binford and Wells [72] published a proteomic analysis

by mass spectrometry of the venoms of 10 different species of spiders from *Loxosceles* genus (*L. arizonica*, *L. deserta*, *L. apachea*, *L. alamosa*, *L. reclusa*, *L. rufescens*, *L. laeta*, *L. speluncarum*, *L. sp.* Hoogenoeg, and *L. spinulosa*), describing the presence of toxins with molecular masses between 31 and 35 kDa, which were characterized as sphingomyelinases-D in all venoms. This work confirmed the idea of a family of these toxins in different Brown spider venoms (inter-species) and within the same venom (intra-species), since the study also showed the presence of more than one molecule in the mass range of sphingomyelinases-D within the same species. Additionally, Machado et al. [26] analyzed the venoms of *Loxosceles intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* (three South American Brown spider species), using several techniques, such as two-dimensional electrophoresis, amino acid sequencing, Edman degradation, immunostaining and mass spectrometry. Data obtained classified at least eight toxins as sphingomyelinases-D isoforms in the three different venoms, strengthening the results regarding the existence of an intra-species and inter-species families of these enzymes. In addition, *L. gaucho* venom was fractionated and studied by mass spectrometry, which enabled the detection of 11 isoforms of toxins similar to sphingomyelinase-D. At this time, different venoms of *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. similis* and *L. adalaida* were analyzed by means of two-dimensional electrophoresis, showing a profile of proteins with enrichment in the region of 30–35 kDa and isoelectric points among 4 to 10, which are compatible of sphingomyelinases-D [73–75].

In 2009, toxins from *Loxosceles intermedia* crude venom were identified using a MudPIT shot-gun approach, and the data confirmed the presence of peptides with homologies to sphingomyelinases-D [76]. In addition, a comprehensive profile of *Loxosceles intermedia* crude venom toxins was obtained by the digestion of the venom followed by the separation of fragments using UHPLC liquid chromatography and analysis by mass spectrometry (ORBITRAP). The final data showed the presence of peptides compatible with different members of the PLD family in the venom, confirming the existence of a large intra-species family of these molecules [77].

7. Cellular Biology of the Brown Spider Venoms PLDs

If on the one hand, the molecular structure and mechanism of Brown spider venom PLDs are reasonably well understood, the cellular biology of envenoming still requires much more learning and molecular detailing. Concerning the pathophysiology of envenoming, literature accepts that Brown spider PLDs trigger their toxic effects evoking an unregulated inflammatory response caused by an uncontrolled activation of neutrophils by endothelial cells, leading to necrosis of tissues [2,5]. The PLDs act on membrane phospholipids or even soluble substrates in tissues of the exposed animals (sphingomyelins and/or lysophosphatidylcholines), generating biologically active lipids, such as ceramide-1-phosphate (C1P) and/or lysophosphatidic acid (LPA), which trigger an endothelial cell-dependent activation of leukocytes, causing an exacerbated inflammatory response and tissue necrosis [78,79]. However, there is no data to sustain if these lipids could be further transformed into the intra- or pericellular environment by the action of kinases, phosphatases or other enzymes, in order to produce derivatives such as ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate from the C1P, as well as phosphatidic acid from LPA. These molecules are also biologically active lipids and important actors involved in leukocyte activation and uncontrolled inflammatory response [79]. It is also not known whether there is an internalization of PLDs by the cells at the bite site region, and subsequent generation of biologically active lipids within the cells, or if lipids generated at the extracellular side of cell membranes by PLDs activity could be translocated into the cells by the change in their hydrophobic coefficient, loss of polar heads and/or phosphate, and then activate cascades of intracellular signaling. Alternatively, lipids generated outside the cells could activate G protein-coupled receptors on plasma membranes. In addition, it has been recently described that these PLDs can generate cyclic lipids such as cyclic ceramide-1-phosphate and cyclic phosphatidic acid [67]. Would these cyclic molecules act directly, or would they be complexed to cellular receptors? Would they be internalized in cells, or would they be transformed into non-cyclic derivatives? These are unanswered questions in the field at this time.

Moreover, concerning the cellular environment of the tissues affected by the PLDs, it is not known which cells are the direct targets of these enzymes. The cellular biology involved in the action of Brown spider PLDs is believed to be related to their actions on endothelial cells [5,28,40], but literature data also point to the role of fibroblasts [80,81], platelets [13,14,48] and erythrocytes [29,82], which could be related to the pathophysiology of envenoming. Currently, there is very little data available that describes how Brown spider venom PLDs would interact with cell membranes. There is no information about if or how these toxins alter the biophysical properties of cell membranes.

The ability of PLDs to interact with the plasma membrane was shown in human red blood cells treated with a PLD of *Loxosceles intermedia* venom. Results showed these enzymes could bind to the surface of erythrocytes stimulating the formation of lipid aggregates, and in some cases disturbing the integrity of these structures. The interaction between PLDs and the surface of cells was also demonstrated by human red blood cells treated with the chimera GFP-PLD, a recombinant PLD fused to a green fluorescent protein (GFP). The linkage could be visualized by the intense cell labeling [82]. These data were reproduced by incubating B16-F10 cells (murine melanoma) with the same chimera (GFP-PLD) and noticing the intense labeling of cells [49]. Alternatively, cells were exposed to PLD, which was further immunodetected by using the respective antibody. However, unlike the erythrocytes that were lysed after treatment with the PLDs, B16-F10 cells did not show any sign of cytotoxicity, suggesting that, in some way, the differences in the composition or organization of membrane lipids on the cells regulates the cytotoxicity of these toxins [49].

The effects of PLDs on artificial membranes were also evaluated using a *Loxosceles laeta* recombinant PLD. The main conclusions were that: the activity of this PLD is clearly influenced by the supramolecular organization of its substrate in the target membrane; the transformation of the target phospholipids (sphingomyelin) into lipid derivatives in the membranes alters the structure and morphology of the membrane, promoting the membrane fusion and generating non-lamellar structures. When recombinant PLD from *Loxosceles laeta* was incubated with giant fluid unilamellar vesicles composed of sphingomyelin containing acyl groups with 12 Carbon (C12SM), it could be observed membrane lipid disorganization, lipid aggregation, tubular projections and destruction of vesicles. The presence of cholesterol in membranes alters and decreases the activity of PLD [83]. The explanation could be linked to the role of cholesterol impairing the interaction between the PLD and SM by changing the transition phase of the membrane. In the case of the vesicles containing more than one substrate, for instance phosphatidylcholine:sphingomyelin:cholesterol, the action of the PLD is different, causing neither the destruction of vesicle, nor the tubular projections, but altering the initial distribution of the substrates in the vesicle. Thus, the effects of PLD enzymes were dependent on lipid composition in the different vesicles tested, explaining why different cells would undergo different actions by PLDs [83].

8. A New Generation of Anti-loxoscelic Sera and Vaccines using *Loxosceles* Recombinant PLDs and Synthetic Peptides

Treatment for victims of Brown spider bites may be symptomatic, based on drugs that seek to block the exacerbated inflammatory response in injured areas. In this case, anti-inflammatory drugs such as dapsone, analgesics and corticosteroids are used. Antihistamines and antibiotics may also be prescribed depending on the presence of allergic reactions and secondary infections in the necrotic lesions of the skin. Procedures that seek to reduce tissue necrosis damage, such as oxygen therapy in hyperbaric chamber and surgical procedures, are also indicated [4,5,84,85]. The only specific treatment, which aims to neutralize venom toxins, is the serum produced in horses using crude venom of Brown spiders. The antigenic conservation among venom toxins from different spider species of *Loxosceles* genus was shown by immunological-cross reaction between sera developed against a particular venom and toxins of other venoms. For example, a serum developed against the crude venom of *Loxosceles gaucho*, which recognizes toxins from *L. laeta* and *L. intermedia* venoms [43]; or a serum produced with the *L. reclusa* venom that also recognizes toxins from the venom of *L. deserta* [86]. Antisera used for Brown spider envenoming treatments are available in countries such as Brazil, Argentina, Mexico

and Peru. In Brazil, venoms of the three species of spiders with greater clinical significance are used (*Loxosceles intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta*) [87]. However, the treatment of loxoscelism based on serum therapy is still controversial, since its efficacy varies according to the different types of accidents, the species involved and mainly the delay in the beginning of the treatment after the bite [2,3,5,85,87]. This variation in the efficacy of antivenoms also happens with some snake antivenoms, mainly regarding neutralization of venom activities from different species of the same genus, and authors suggest the use of a greater antivenom:venom ratio to circumvent this problem [88]. However, the lack of effectiveness of these anti-loxoscelic sera could be related to their low titers of anti-PLD antibodies, and thus fail to neutralize these toxins after envenoming. The discoveries of venom PLDs pointed these toxins as potential targets to be used as antigens for a new anti-loxoscelic serum. They could also be used as antigens to enrich the crude venoms and then generate anti-venom sera with possible better therapeutic response. Three facts strengthen these hypotheses: (i) sera against crude venoms or venom gland homogenates of different species of Brown spiders recognize different members of the PLD family, and neutralize the main effects of these venoms [43,89,90]; (ii) monoclonal antibodies produced against native or recombinant PLD toxins were able to recognize several isoforms of PLDs from different species and neutralize the effects of crude venom or an homologous PLD [50,91]. (iii) sera produced against recombinant PLDs from *L. laeta* neutralize the necrotic and lethal effects of different *Loxosceles* venoms [46,51,52], and sera from mice immunized with a PLD from *L. intermedia* venom protected the animal against dermonecrosis, edema and hemorrhage [60].

However, three facts are relevant in the use of recombinant PLDs as antigens in a novel anti-loxoscelic serum: (i) native recombinant forms are aggressive and cannot be used in high concentrations, since even horses could have important side effects or die, thus restricting the production of anti-PLD antibodies. (ii) Although there is an immunological cross reaction and conservation of epitopes among PLDs of different species of spiders from *Loxosceles* genus, the ideal strategy for neutralization of the pathological effects observed in accidents would be to use a mixture of recombinant PLDs of the main species geographically involved in the accidents in each country or region (for instance in the case of Brazil and South America, *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta*; in the case of North America, *L. reclusa*, *L. deserta*, and *L. arizonica*). (iii) Other toxins in *Loxosceles* venoms may also act to increase the deleterious effects of PLDs, such as the so-called spreading factors. These toxins modify the organization of the extracellular matrix at the site of venom inoculation, and causes the disruption of adhesive cellular junctions, rendering the tissues looser by increasing capillary permeability and favoring the local and systemic spread of other toxins and host cells. Also, transcriptome analyzes and recombinant expression of toxins have pointed the presence of allergenic toxins in the venoms, a fact that could increase inflammatory response and facilitate the spreading of other toxins. In the case of *Loxosceles* venoms, at least three families of toxins with these characteristics were already described: LALPs (astacin-like metalloproteases) [92–95], LiTCTP (Translationally-Controlled Tumor Protein) family member with allergenic properties [96,97], and hyaluronidases [98–100].

In this sense, the development of a more efficient serum relies in studies that search for the relationship between structure and function, associated with site-directed mutation techniques [61,63,101,102] which described the amino acids involved in the catalysis and the binding of the *Loxosceles* PLDs with lipid substrates. Mutated variants of recombinant PLDs, previously described here, could be used as antigens in high concentrations in animals and give rise to a second generation anti-loxoscelic serum with higher antibody titers. Theoretically, this serum could neutralize in a more efficient way the deleterious effects of loxoscelic envenoming PLDs. On the other hand, these same mutated toxins could still be used as protective antigens in the construction of anti-loxoscelic vaccines, which could be indicated in endemic regions such as South America [2,5], or as veterinary use in domesticated animals, as well as in livestock, a quite common possibility [103].

It is also possible to use synthetic antigens containing antigenic determinants of toxins, which could generate antibodies that reduce the symptoms of envenoming. Linear synthetic peptides or

mimotopes, based on a PLD sequences from *L. intermedia* venom, generated polyclonal antibodies that were able to block toxic effects evoked by the crude venom and/or recombinant PLDs [56,104,105]. In the same rationale, linear synthetic peptides, constructed based on PLDs sequences from *L. laeta*, *L. intermedia*, and *L. gaucho* venoms, are recognized by anti-venom sera from these spiders, indicating their potential as useful reagents to produce antibodies against *Loxosceles* venoms [106]. In addition, chimeras containing antigenic determinants of PLDs, LALPs and hyaluronidases could be synthesized to generate antibodies that act synergistically in the inhibition of envenoming. In fact, a synthetic chimera containing sequences of PLDs from *L. intermedia* and *L. laeta* venoms, and sequences of a LALP and hyaluronidase isoforms from *L. intermedia* venom was recently constructed. This fusion molecule stimulated the production of polyclonal antibodies which recognized venoms of the different species of *Loxosceles*, and blocked the activities of PLDs, metalloproteases and hyaluronidases present in the venoms [107].

In the near future, it is expected a new second-generation anti-*Loxosceles* serum and a protocol for vaccines using mutated recombinant PLDs from different species of *Loxosceles* alone or as antigen for crude venom enrichment, and also synthetic antigens containing antigenic determinants from different *Loxosceles* toxins. These molecules and strategies could be used to improve the specific treatment of loxoscelism, mitigating the suffering caused in several regions of the world where these accidents are endemic and recurrent. The use of recombinant forms of loxoscelic PLDs or synthetic peptides mimicking sequences of these enzymes was already considered an effective strategy in the generation of sera with high antibody titers, high neutralization capacity and therapeutic potential [108]. It is important to mention that these initiatives would not alter the production lines of conventional sera.

9. Brown Spider PLDs as Models for the Discovery of Specific Treatments for Loxoscelism and as Tools in New Anti-inflammatory Drugs Description

For all of its biological properties, pathological involvement and biochemical characteristics [2,5], Brown spider venom PLDs are important targets for inhibitory drug discoveries focusing on the clinical treatment of loxoscelism. These enzymes have also a great potential as modulators of various inflammatory processes, since they induce the formation of lipids which are involved in the cellular inflammatory response [5,30,109]. There is no data in literature regarding the molecular mechanisms of the intracellular signaling cascade activation in cells exposed to Brown spider venoms or their PLDs. Likewise, there are no data in the literature describing which molecules or intracellular signaling pathways are activated or blocked in cells exposed to PLDs of *Loxosceles* spider venoms to induce the exacerbated inflammatory response. If the action of *Loxosceles* PLDs on the membranes of injured host cells or surrounding fluids generates biologically active lipids, it is expected the participation of receptors of these phospholipid derivatives, such as those coupled to protein G, and the generation of intracellular secondary messengers, in addition to the activation of different genes [79,110–112].

In fact, it has been demonstrated that the treatment of cultured fibroblasts with a recombinant PLD from the venom of *L. reclusa* led to the activation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 pro-inflammatory genes [80]. In the same rationale, the secretion of these cytokines increased following treatment of human fibroblasts in culture with *L. similis* crude venom, or with a recombinant PLD of *L. intermedia* via the activation of lysophosphatidic acid receptors. On the other hand, when fibroblasts were treated with Ki16425, an antagonist of lysophosphatidic acid receptor, the release of these cytokines decreased [81]. In addition, the treatment these cells with recombinant PLDs from *L. laeta* venom increased the expression and secretion of IL-6 and IL-8 cytokines, and CXCL1/GRO-Alpha and CCL2/MCP-1 chemokines, which increased monocyte migration, and whose secretions were blocked by the use of anti-PLD antibodies in culture conditions [58]. Thus, these pathways are potential targets for drugs aiming loxoscelism.

Based on in silico analyzes, biochemical experiments, thermodynamic studies, structural analyzes and biological evidences on cells and animals exposed to a recombinant PLD from *Loxosceles intermedia* venom, it was shown that the drug suramin was able to inhibit various biological activities. Suramin, a

former drug used in the treatment of protozoa and especially African Trypanosomiasis, blocked PLDs effects, such as hemolytic, necrotic and pro-inflammatory effects, as well as biochemical properties such as sphingomyelin degradation. Molecular dynamics and docking studies showed suramin interacts with the PLD catalytic site, especially with Histidine-12 and Histidine-47 amino acids residues, in addition to Mg^{+2} ion, involved in the enzyme catalysis [113]. Such pioneering studies opened the possibility of using suramin or pharmaceutical analogues (belonging to the polysulfonated naphthylurea group) as potential inhibitors of *Loxosceles* PLDs.

It was also proposed the use of tetracycline in the treatment of loxoscelism, since cells exposed to *Loxosceles* venom PLDs increased the expression of extracellular matrix metalloproteases (MMPs). Tetracycline indirectly inhibits these proteases, thus blocking PLDs effects. Experiments with cells and animals exposed to a recombinant PLD from *Loxosceles intermedia* venom showed that tetracycline treatments were able to protect them from the dermonecrotic activity [114] and nephrotoxic effects [115] caused by envenoming. This data opened up the possibility to use tetracycline in the local and systemic treatment of loxoscelism. The knowledge in this field will not only contribute to advances in cellular mechanism of loxoscelism, but may also generate target molecules for the discovery of inhibitory drugs of receptor/signaling cascade involved in the lipid-dependent inflammatory response generated by *Loxosceles* venom PLDs.

10. Diagnosis of Loxoscelism Based on the Identification of PLDs or Related Products

Although the involvement of Brown spiders in the necrotic picture presented by injured patients has been described for a long time [22], to date, there is not a single direct laboratory method for loxoscelism diagnosis. Nowadays, the diagnosis is mainly based on the capture of the spider shortly after the accident (which is not always possible) and its presentation in the Medical Centers for the correct identification, or on the epidemiology and natural geographic distribution of *Loxosceles* genus species (as is often the case in Southern Brazil), or even on the clinical signs and symptoms presented by the patients. The exclusion of other etiologies of dermonecrosis, although essential, are commonly a tough task for physicians [2,4,5]. Undoubtedly, the existence of a family of isoforms or homologs of PLDs in different *Loxosceles* venoms [5,6] confers to these molecules an enormous potential in the diagnosis of loxoscelism. At present, clinicians involved in the diagnosis and treatment of the injured patient can request skin biopsies from the regions of spider bite in inconclusive cases. The histopathological diagnosis is based on the characteristics described in experimental models (rabbits) exposed to the crude venoms of Brown spiders and/or native or recombinant *Loxosceles* PLDs [2,20].

The infrared thermography was proposed to aid in the diagnosis of loxoscelism, since it detects and quantifies the body surface temperature, which may reflect the presence of a huge inflammatory response at the site of the accident [116]. Although it is a non-invasive technique, the simple detection of an inflammatory response at the injured site does not necessarily reflect specifically accidents with Brown spiders and exposure to PLDs. There are reports of an increase in body surface temperature in several other medical conditions, including accidents with other venomous animals [116]. However, together with other signs and epidemiology of loxoscelism, this can be an interesting strategy, since it is a non-invasive method and there is a clinical correlation with injured victims. Several attempts have been done to identify toxins at samples from injured patients or experimental animal models inoculated with crude venom. Barrett et al. [117] proposed a haemagglutination inhibition test for the diagnosis of Brown spider accidents based on analyzes of skin samples of guinea pigs exposed to the venom of *Loxosceles reclusa*. Later, literature described an immunodiagnostic test (ELISA sandwich) capable of detecting toxins of the crude venoms of *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*, in mice inoculated with the respective venoms of these spiders [118]. In this same rationale of immunodiagnosis, Miller et al. [119] proposed a diagnostic method based on the competition ELISA technique, using as reagent a polyclonal serum that recognized crude venom. This study analyzed biopsies of skin lesions from patients envenomed by *L. deserta*. Additionally, a new method for the diagnosis of accidents, based on ELISA, was proposed using biopsies and fluids of skin lesions from injured patients [120,121].

Although all of these methods describe the potential to find toxins of *Loxosceles* venoms in the samples tested—even collected a few days after the accidents—none of them were unfortunately incorporated into the clinical routine of detection and treatment for the loxoscelism. This is most likely related to the low sensitivity of the method, the invasive aspect of sample collection, and the lack of clinical correlation. Alternatively, a noninvasive method was proposed in which samples of skin lesions from victims of *L. reclusa* were collected with swab moistened with water saline solution and analyzed by ELISA. The protocol used polyclonal antibodies that recognize toxins from the crude venom of *Loxosceles reclusa*. By this proposed method, the authors were able to recover and detect *Loxosceles* toxins in samples collected from the skin of different patients: approximately 34.0 picograms [122], between 4.5 and 8.2 picograms [123] or 190.0 femtograms of total toxins per ELISA well [124]. Still using this same method of immunodetection, tests were made to study the sensitivity of the method to recover and detect these toxins accordingly to the time after exposition to the venom. The authors used rabbits exposed to the crude venom as experimental model and swabs to collect skin samples. Toxins, including PLDs, could be recovered and detected up to 21 days after the exposure to the venom [125]. This method is not invasive and have clinical correlations of the patients with those described with loxoscelism; however, there is no data confirming that the reagents used would also be able to detect toxins of other species of *Loxosceles* spiders. In addition to that, the methodology is not available on the market for large-scale analyzes.

Nowadays, with the advent of recombinant *Loxosceles* PLDs, ELISA methods availability and previous description, this immunodetection tests could be improved by the generation of monospecific polyclonal antibodies. This would allow PLDs recognition of different species of *Loxosceles* spiders, and also the possibility of using monoclonal antibodies for sandwich ELISA tests. Such methods, based on the search for PLD antigens in samples collected from skin lesions of victims, could be directed to these toxins by the high biological conservation of these molecules in the different venoms [5,6] and for their high determinant antigenic properties [107].

Although there are no published data in scientific literature, the diagnoses for accidents could also be based on other biological samples different from the lesions in bite sites. Urine tests could be performed for searching PLDs or their metabolized fragments, since envenoming causes renal damage and PLDs are directly involved with these lesions. It was already shown that PLDs bind to renal structures such as glomeruli and renal tubules, and thus could be excreted in the urine [47,59,73].

Methods for diagnosis of accidents with arachnids, among them Brown spiders, was a theme discussed by an article recently published. The authors discuss the limitations, propose techniques and recommendations that in the near future may originate laboratory methods for loxoscelism diagnosis involving detection of PLDs [126]. However, it has been recently described that patients who never had contact with spider venoms of the genus *Loxosceles* have antibodies that recognize PLDs from the venom of *L. laeta* and even other *Sicarius* spiders [127]. This could lead to false positive results in immunoassays such as ELISA and western blotting. These data indicate that other studies looking for further information on the antigenicity of these toxins need to be made, and the possible non-specific interference of these antibodies in immunoreactivity in laboratory diagnostics must be considered.

Alternatively, the immunodiagnosis of loxoscelism could be done by using monoclonal antibodies that recognize PLDs from the *L. intermedia* venom, but manipulated by protein engineering, yielding a chimera containing a fragment of the IgG molecule bound to the alkaline phosphatase enzyme. Antigens from *Loxosceles* could be detected in the fluids of injured patients or samples collected at the spider bite site. A recombinant chimera was able to recognize PLDs from *L. intermedia* venom in immunoassays, with detection limits of up to 39 ng/mL [128].

In addition, highly sensitive molecular biology methods such as PCR could be used to look for DNA signals from PLD genes at the injured site. Venoms are holocrine secretions [129] and can contain cells from the venom-producing glands and their DNA. In this rationale, using two recombinant isoforms of the *L. laeta* venom, six RNA aptamers capable of inhibiting the phospholipase activity of

these enzymes were described and, therefore, theoretically could be efficient in their identifications as a screening for possible diagnosis [130].

In summary, we already have, nowadays, a good knowledge regarding the components of the venoms, especially the PLDs. This should in a near future support a direct laboratory method capable of diagnosing accidents by Brown spider bites available for the medical community.

11. Biotechnological Applications of *Loxosceles* PLDs

The biotechnological use of venom toxins, and products of secretions of venomous animals, is a consolidated reality with several examples in the literature. There are several described products synthesized, based on molecular and biological properties of venom toxins from snakes, mollusks, bees, spiders, and scorpions—among other animals. The direct application of these toxins as biological reagents or drugs by pharmaceutical companies is also reported. In addition, there are several examples of the use of medicines based on venom toxins: in the treatment of hypertension, myocardial infarction, stroke, ischemia, diabetes, hemostatic disturbances, pain, neurological alterations, and autoimmune diseases, among others [131–137].

Undoubtedly, the PLDs of the *Loxosceles* venoms, due to their biochemical and biological properties, are examples of great biotechnological potential for pharmaceutical and chemical industries, among others. Biochemical properties modulating cell phospholipids, are extremely interesting and useful properties in technological applications, especially now with the availability of high concentrations of soluble and functional recombinant isoforms of several *Loxosceles* PLDs. These enzymes can be used not only as biological reagents for the experimental generation of these lipids, but also for studies related to the receptors and cellular cascades involved in these activities. In this field, the activity of these PLDs generating the production of cyclic forms of ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid [67], enables the use of these enzymes as catalysts in reactions of transphosphatidylation for the industrial production of cyclic forms of lipids.

The insecticidal activity of Brown spider PLDs, described for the recombinant enzymes of *L. arizonica* and *L. intermedia* [12], This work, Figure 1E, is another potential applicability of these molecules that can be exploited. After the full mechanism of cytotoxicity and neurotoxicity is known, it will be possible to optimize these molecules and use them in this field that is constantly demanding new technologies.

Additionally, the new enzyme engineering methodologies which permit modifications in the primary structures of these PLDs, and consequent alterations in the biochemical and biological properties, can alter properties causing inhibition or even activation of mutated isoforms, thus creating mutants with enormous biotechnological potential. Finally, complementing these data, the modern biophysical techniques of studies of protein structures can provide information that was previously unavailable, opening great possibilities for technological applicability of these molecules.

As already discussed here, it is a great possibility to apply these toxins to produce a second generation anti-*Loxosceles* serum, protective vaccines against the toxic effects of envenomation and laboratory methods for immunodiagnostic of loxoscelism. In both cases, either by engineering enzymes originating mutated recombinant forms with preserved conformational structures, or using synthetic chimeras, the amount of antigen generated is large, favoring the production of sera with higher titers of anti-PLD antibodies and vaccines.

A new possibility of biotechnological application of loxoscelic PLDs is their use as biological reagents for research protocols in the field of biological sciences, especially in cell biology, pharmacology, immunology, hematology, and biochemistry. These enzymes have modulatory activities on various cells, such as erythrocytes, neutrophils, platelets, endothelium, fibroblasts, lymphocytes and renal cells, among others. PLDs as bio-tools could be used in research protocols that require positive controls of cell changes. The direct or complement-dependent hemolytic activities of these toxins [29,61,82,138], provide the use of PLDs in functional studies on red blood cells. The effects of inflammatory response and indirect activation of neutrophils [13,14,28,48,81] enable these enzymes to function as excellent tools

for studies on the release of inflammatory mediators such as cytokines and chemokines. Moreover, the platelet-aggregating activities of PLDs from *Loxosceles* [13,48,53] indicate that these toxins could be used as modulating agents for platelet aggregation in experimental or diagnostic protocols in the hematology area. The action of PLDs of *Loxosceles* venoms on blood vessel endothelial cells [28], enable these PLDs as useful biological tools in experimental protocols that study endothelial cells. In addition, the action of recombinant isoforms of PLDs on cultured fibroblasts [80,81], which triggers the production and secretion of cytokines and chemokines, render these toxins as useful tools for experimental protocols to study fibroblasts. Finally, the effects of PLDs on renal cells [47,59] qualify these molecules as potentially useful in experimental studies on nephrotoxicity. Not to mention the hypothesis of tumor cell modulating activity after treatment with PLDs of Brown spider venoms, which by stimulating the formation of bioactive lipids, as lysophospholipids or sphingophospholipids derivatives, can modulate tumor cell growth, migration or survival [139]. In fact, several phospholipases-D have been described as modulating malignant characteristics of tumor cells [140]. An important example is autotaxin, a PLD secreted by tumor cells, which seems to confer greater migratory potential for tumor cells, and thus increase the potential for metastasis occurrence [141]. In summary, the cytomodulatory potential of *Loxosceles* PLDs on different cells enables these enzymes as excellent tools in cell biology.

12. Actions Expected for the Future of *Loxosceles* PLD Researches

The *Loxosceles* genus spiders have a worldwide distribution, with 156 different species of these arachnids described in the world [142]. Loxoscelism is a global problem, but it prevails in the areas with warmer climates of South America, North America, Mediterranean Europe and Africa. In some regions of countries such as Brazil, Chile, and Peru, loxoscelism is considered a public health problem due to the high frequency of accidents [5,85]. Although there are a large number of different species of Brown spiders, the species with medical relevance are few in number, prevailing in North America *Loxosceles reclusa*, *L. deserta*, and *L. arizonica*, and in South America *L. intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta* [5,6,85,143,144]. The PLDs present in *Loxosceles* spider venoms are the major toxins concerning the effects triggered by envenomation. Despite the breakthrough in the last 40 years there are many data and expectations concerning the research of these enzymes which need to be addressed for the future. Undoubtedly, the improvement of specific treatments for loxoscelism is a necessity and it clearly involves the PLDs. A targeted therapy may be achieved by using these toxins for synthetic chemical antagonist designs or as recombinant antigens, which may enhance the quality and efficiency of anti-loxoscelic sera and allow the production of vaccines. Moreover, available information on the structural characteristics of the *Loxosceles* venoms PLDs can be used to search chemical libraries and identify drugs with inhibitory action on these toxins, therefore, there is a great potential for discoveries of new treatments. In this regard, synthetic antigens containing linear sequences of the PLDs may also be useful in this approach. For these purposes, analyzes of the structures and functions, bioinformatics and molecular dynamics relations can give an exact description of the catalysis mechanisms, which amino acid residues participate in the degradation of the substrates, as well as details on the PLD-substrate interactions. It is also expected that all the scientific knowledge on the PLDs will be used to improve the diagnosis of loxoscelism and, in the end, a laboratorial method could be established, ideally non-invasive and sensitive, which is able to diagnose the accidents. There is also a lot yet to be studied and discovered on the degradation of cellular phospholipid substrates, cellular receptors and cascades of activated intracellular signaling, bringing more rational parameters on PLD toxins and on the loxoscelism. In the basic research field, new isoforms of recombinant PLDs can be obtained not only in bacterial models as available today, but using other heterologous expression systems, such as yeast and insect cells, and thus yield information not currently available. Standardizations of co-crystals of PLDs and phospholipid substrates, as well as drugs that could interact with these toxins, will provide information on the mechanistic of these enzymes. These perspectives discussed here are summarized in Figure 4. In short, although much scientific knowledge has been described concerning the PLDs from *Loxosceles* spider venoms, bringing

a huge gain in learning about these molecules and on loxoscelism, much is yet to be done to alleviate the suffering of injured patients. We hope that in the coming years gaps will be closed and science will improve learning in this amazing field of toxinology. Brown spider PLDs: much learning, but still much to be done on this great avenue.

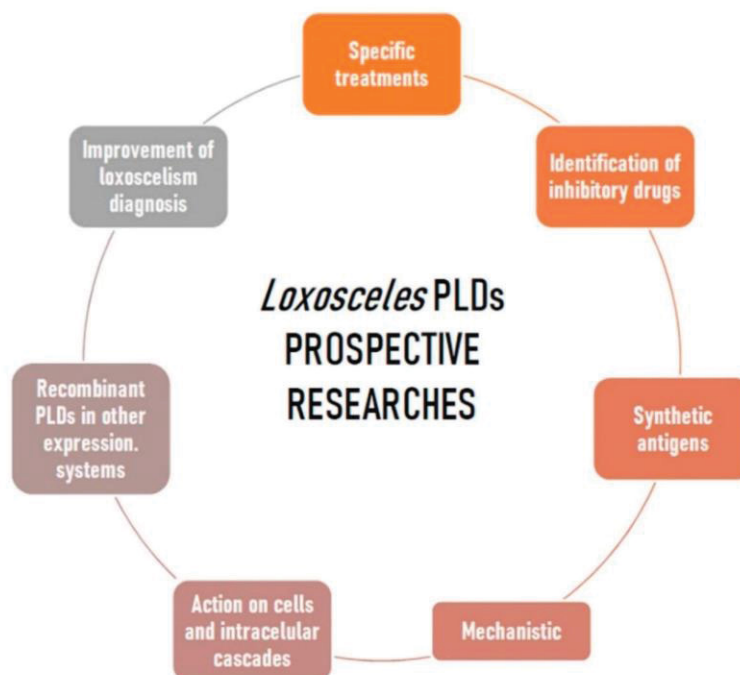


Figure 4. Actions expected for the future of *Loxosceles* PLD researches.

Author Contributions: Conceptualization, S.S.V.; methodology, H.C.d.J., T.P.d.S., N.L.C.P. and B.C.A.; validation, J.C.M. and A.C.M.W.; resources, S.S.V. and R.K.A.; data curation, L.H.G.; writing—original draft preparation, S.S.V., L.H.G. and R.K.A.; writing—review and editing, A.S.-R.; supervision, L.H.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We gratefully acknowledge grants from Fundação Araucária 057/2017, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 408633/2018-2, 303868/2016-3, 309940/2019-2 and 307338/2014-2; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2019/10475-2, 2915/18868-2 and 2015/13765-0; Universidade Federal do Paraná – FUNPAR 04/2018. The APC was funded by Universidade Federal do Paraná.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Da Silva, P.H.; Hashimoto, Y.; Dos Santos, F.A.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2003**, *42*, 155–161. [\[CrossRef\]](#)
2. Da Silva, P.H.; Da Silveira, R.B.; Helena Appel, M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* **2004**, *44*, 693–709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Hogan, C.J.; Barbaro, K.C.; Winkel, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* **2004**, *44*, 608–624. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Barceloux, D.G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008; ISBN 9780471727613.

5. Gremski, L.H.; Trevisan-Silva, D.; Ferrer, V.P.; Matsubara, F.H.; Meissner, G.O.; Wille, A.C.M.; Vuitika, L.; Dias-Lopes, C.; Ullah, A.; De Moraes, F.R.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon* **2014**, *83*, 91–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chaves-Moreira, D.; Senff-Ribeiro, A.; Wille, A.C.M.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2017**, *23*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sams, H.H.; Dunnick, C.A.; Smith, M.L.; King, L.E. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2001**, *44*, 561–576. [[CrossRef](#)]
8. Gremski, L.H.; Da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Probst, C.M.A.; Ferrer, V.P.; Nowatzki, J.; Weinschutz, H.C.; Madeira, H.M.I.; Gremski, W.; Nader, H.B.; et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2403–2416. [[CrossRef](#)]
9. Fernandes-Pedrosa, M.; de, F.; Junqueira-de-Azevedo, I.D.L.M.; Gonçalves-de-Andrade, R.M.; Kobashi, L.S.; Almeida, D.D.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 279. [[CrossRef](#)]
10. Dantas, A.E.; Carmo, A.O.; Horta, C.C.R.; Leal, H.G.; Oliveira-Mendes, B.B.R.; Martins, A.P.V.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. *Toxicon* **2016**, *120*, 97–106. [[CrossRef](#)]
11. Segura-Ramírez, P.J.; Silva Júnior, P.I. *Loxosceles gaucho* spider venom: An untapped source of antimicrobial agents. *Toxins* **2018**, *10*, 522. [[CrossRef](#)]
12. Zobel-Thropp, P.A.; Kerins, A.E.; Binford, G.J. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon* **2012**, *60*, 265–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Da Silveira, R.B.; Pigozzo, R.B.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Dreyfuss, J.L.; Toma, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; et al. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie* **2006**, *88*, 1241–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Da Silveira, R.B.; Pigozzo, R.B.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Silva, D.T.; Dreyfuss, J.L.; Toma, L.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S.; et al. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie* **2007**, *89*, 289–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ribeiro, R.O.S.; Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Gremski, L.H.; Sade, Y.B.; Paludo, K.S.; Senff-Ribeiro, A.; de Moura, J.; Chávez-Olórtegui, C.; Gremski, W.; et al. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 1162–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vuitika, L.; Gremski, L.H.; Belisário-Ferrari, M.R.; Chaves-Moreira, D.; Ferrer, V.P.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 2479–2492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ospedal, K.Z.; Appel, M.H.; Neto, J.F.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Exp. Pathol.* **2002**, *83*, 287–294. [[CrossRef](#)]
18. De Santi Ferrara, G.I.; Fernandes-Pedrosa, M.; de, F.; Junqueira-de-Azevedo, I.; de, L.M.; Gonçalves-de-Andrade, R.M.; Portaro, F.C.V.; Manzoni-de-Almeida, D.; Murakami, M.T.; Arni, R.K.; et al. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon* **2009**, *53*, 743–753. [[CrossRef](#)]
19. Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948. [[CrossRef](#)]
20. Futrell, J.M. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* **1992**, *304*, 261–267. [[CrossRef](#)]
21. Atkins, J.A.; Wingo, C.W.; Sodeman, W.A. Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest. *Science* **1957**, *126*, 73. [[CrossRef](#)]
22. Atkins, J.A.; Wingo, C.W.; Sodeman, W.A.; Flynn, J.E. Necrotic arachnidism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1958**, *7*, 165–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Forrester, L.J.; Barrett, J.T.; Campbell, B.J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *187*, 355–365. [\[CrossRef\]](#)
24. Kurpiewski, G.; Forrester, L.J.; Barrett, J.T.; Campbell, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *BBA-Gen. Subj.* **1981**, *678*, 467–476. [\[CrossRef\]](#)
25. Gates, C.A.; Rees, R.S. Serum amyloid P component: Its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase D purified from the venom of the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). *Toxicon* **1990**, *28*, 1303–1315. [\[CrossRef\]](#)
26. Machado, L.F.; Laugesen, S.; Botelho, E.D.; Ricart, C.A.O.; Fontes, W.; Barbaro, K.C.; Roepstorff, P.; Valle De Sousa, M. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucha* venom. *Proteomics* **2005**, *5*, 2167–2176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Lee, S.; Lynch, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* **2006**, *391*, 317–323. [\[CrossRef\]](#)
28. Chaim, O.M.; Da Silveira, R.B.; Trevisan-Silva, D.; Ferrer, V.P.; Sade, Y.B.; Bóia-Ferreira, M.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Takahashi, H.K.; et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, *1811*, 84–96. [\[CrossRef\]](#)
29. Chaves-Moreira, D.; Souza, F.N.; Fogaça, R.T.H.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 2529–2540. [\[CrossRef\]](#)
30. Lajoie, D.M.; Roberts, S.A.; Zobel-Thropp, P.A.; Delahaye, J.L.; Bandarian, V.; Binford, G.J.; Cordes, M.H.J. Variable substrate preference among phospholipase D toxins from sicariid spiders. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 10994–11007. [\[CrossRef\]](#)
31. Kalapothakis, E.; Chatzaki, M.; Gonçalves-Dornelas, H.; de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Laborne, F.V.; de Moura, J.F.; Veiga, S.S.; Chávez-Olórtegui, C.; Granier, C.; et al. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 938–946. [\[CrossRef\]](#)
32. Binford, G.J.; Cordes, M.H.J.; Wells, M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: Evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* **2005**, *45*, 547–560. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Binford, G.J.; Callahan, M.S.; Bodner, M.R.; Rynerson, M.R.; Núñez, P.B.; Ellison, C.E.; Duncan, R.P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2008**, *49*, 538–553. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Binford, G.J.; Bodner, M.R.; Cordes, M.H.J.; Baldwin, K.L.; Rynerson, M.R.; Burns, S.N.; Zobel-Thropp, P.A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 547–566. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Denny, W.F.; Dillaha, C.J.; Morgan, P.N. Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusa* venom: In vivo and in vitro studies. *J. Lab. Clin. Med.* **1964**, *64*, 291–298. [\[PubMed\]](#)
36. Morgan, P.N.; Felton, W.W. Utilization of mammalian cell cultures in spider venom studies. *Bact. Proc.* **1965**, *133*, 276.
37. Smith, C.W.; Micks, D.W. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. *Lab. Investig.* **1970**, *22*, 90–93. [\[PubMed\]](#)
38. Majeski, J.A.; Stinnett, J.D.; Alexander, J.W.; Durst, G.G. Action of venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) on human neutrophils. *Toxicon* **1977**, *15*, 423–427. [\[CrossRef\]](#)
39. Kniker, W.T.; Morgan, P.N.; Flanigan, W.J.; Reagan, P.W.; Dillaha, C.J. An inhibitor of complement in the venom of the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1969**, *131*, 1432–1434. [\[CrossRef\]](#)
40. Patel, K.D.; Modur, V.; Zimmerman, G.A.; Prescott, S.M.; McIntyre, T.M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. *J. Clin. Investig.* **1994**, *94*, 631–642. [\[CrossRef\]](#)
41. Barbaro, K.C.; Cardoso, J.L.C.; Eickstedt, V.R.D.; Mota, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucha* spider venom. *Toxicon* **1992**, *30*, 331–338. [\[CrossRef\]](#)

42. Tambourgi, D.V.; Magnoli, F.C.; von Eickstedt, V.R.D.; Benedetti, Z.C.; Petricevich, V.L.; Da Silva, W.D. Incorporation of a 35-Kilodalton Purified Protein from *Loxosceles intermedia* Spider Venom Transforms Human Erythrocytes into Activators of Autologous Complement Alternative Pathway. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4459–4466. [[PubMed](#)]
43. Barbaro, K.C.; Ferreira, M.L.; Cardoso, D.F.; Eickstedt, V.R.D.; Mota, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 1491–1497. [[PubMed](#)]
44. Tambourgi, D.V.; Magnoli, F.C.; Van Den Berg, C.W.; Morgan, B.P.; De Araujo, P.S.; Alves, E.W.; Da Silva, W.D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 366–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kalapothakis, E.; Araujo, S.C.; De Castro, C.S.; Mendes, T.M.; Gomez, M.V.; Mangili, O.C.; Gubert, I.C.; Chávez-Olortegui, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* **2002**, *40*, 1691–1699. [[CrossRef](#)]
46. Fernandes Pedrosa, M.D.F.; Junqueira de Azevedo, I.D.L.M.; Gonçalves-de-Andrade, R.M.; Van Den Berg, C.W.; Ramos, C.R.R.; Lee Ho, P.; Tambourgi, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 638–645. [[CrossRef](#)]
47. Chaim, O.M.; Sade, Y.B.; Da Silveira, R.B.; Toma, L.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olortegui, C.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Von Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 64–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Appel, M.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Paludo, K.S.; Silva, D.T.; Chaves, D.M.; da Silva, P.H.; Mangili, O.C.; Senff-Ribeiro, A.; Gremski, W.; et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2008**, *1780*, 167–178. [[CrossRef](#)]
49. Wille, A.C.M.; Chaves-Moreira, D.; Trevisan-Silva, D.; Magnoni, M.G.; Boia-Ferreira, M.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; Chaim, O.M.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S.S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2013**, *67*, 17–30. [[CrossRef](#)]
50. Dias-Lopes, C.; Felicori, L.; Rubrecht, L.; Cobo, S.; Molina, L.; Nguyen, C.; Galéa, P.; Granier, C.; Molina, F.; Chávez-Olortegui, C. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. *Vaccine* **2014**, *32*, 2086–2092. [[CrossRef](#)]
51. Olvera, A.; Ramos-Cerrillo, B.; Estévez, J.; Clement, H.; de Roodt, A.; Paniagua-Solís, J.; Vázquez, H.; Zavaleta, A.; Salas Arruz, M.; Stock, R.P.; et al. North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* **2006**, *48*, 64–74. [[CrossRef](#)]
52. Catalán, A.; Cortes, W.; Sagua, H.; González, J.; Araya, J.E. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: Cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2011**, *25*, 393–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Magalhães, G.S.; Caporrino, M.C.; Della-Casa, M.S.; Kimura, L.F.; Prezotto-Neto, J.P.; Fukuda, D.A.; Portes-Junior, J.A.; Neves-Ferreira, A.G.C.; Santoro, M.L.; Barbaro, K.C. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucha* venom gland. *Biochimie* **2013**, *95*, 1773–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tambourgi, D.V.; Pedrosa, M.D.F.F.; Van Den Berg, C.W.; Gonçalves-De-Andrade, R.M.; Ferracini, M.; Paixão-Cavalcante, D.; Morgan, B.P.; Rushmere, N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 831–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Felicori, L.; Araujo, S.C.; Machado de Ávila, R.A.; Sanchez, E.F.; Granier, C.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olortegui, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon* **2006**, *48*, 509–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- intermedia (Brown Spider) Venom in Renal Tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 455–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Pretel, F.; Gonçalves-De-Andrade, R.M.; Magnoli, F.C.; Da Silva, M.E.R.; Ferreira, J.M.C.; Van Den Berg, C.W.; Tambourgi, D.V. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adalaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon* **2005**, *45*, 449–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 75. Silvestre, F.G.; Castro, C.S.D.; Moura, J.F.D.; Giusta, M.S.; De Maria, M.; Álvares, É.S.S.; Lobato, F.C.F.; Assis, R.A.; Gonçalves, L.A.; Gubert, I.C.; et al. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* **2005**, *46*, 927–936. [[CrossRef](#)]
 76. Dos Santos, L.D.; Dias, N.B.; Roberto, J.; Pinto, A.S.; Palma, M.S. Brown recluse spider venom: Proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 933–943. [[CrossRef](#)]
 77. Trevisan-Silva, D.; Bednaski, A.V.; Fischer, J.S.G.; Veiga, S.S.; Bandeira, N.; Guthals, A.; Marchini, F.K.; Leprevost, F.V.; Barbosa, V.C.; Senff-Ribeiro, A.; et al. A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. *Sci. Data* **2017**, *4*, 1–7. [[CrossRef](#)]
 78. Gomez-Muñoz, A.; Gangoiti, P.; Arana, L.; Ouro, A.; Rivera, I.G.; Ordoñez, M.; Trueba, M. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 1060–1066. [[CrossRef](#)]
 79. MacEyka, M.; Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **2014**, *510*, 58–67. [[CrossRef](#)]
 80. Dragulev, B.; Bao, Y.; Ramos-Cerrillo, B.; Vazquez, H.; Olvera, A.; Stock, R.; Algaron, A.; Fox, J.W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: Insights into spider venom dermonecrosis [2]. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 1264–1266. [[CrossRef](#)]
 81. Horta, C.C.R.; Oliveira-Mendes, B.B.R.; Do Carmo, A.O.; Siqueira, F.F.; Barroca, T.M.; Dos Santos Nassif Lacerda, S.M.; De Almeida Campos, P.H.; De França, L.R.; Ferreira, R.L.; Kalapothakis, E. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *loxosceles* spider venom. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 1682–1685. [[CrossRef](#)]
 82. Chaves-Moreira, D.; Chaim, O.M.; Sade, Y.B.; Paludo, K.S.; Gremski, L.H.; Donatti, L.; De Moura, J.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Da Silveira, R.B.; et al. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 655–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 83. Stock, R.P.; Brewer, J.; Wagner, K.; Ramos-Cerrillo, B.; Duelund, L.; Jernshøj, K.D.; Olsen, L.F.; Bagatolli, L.A. Sphingomyelinase D activity in model membranes: Structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 84. Andersen, R.J.; Campoli, J.; Johar, S.K.; Schumacher, K.A.; Allison, E.J. Suspected brown recluse envenomation: A case report and review of different treatment modalities. *J. Emerg. Med.* **2011**, *41*, e31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 85. Isbister, G.K.; Fan, H.W. Spider bite. *Lancet* **2011**, *378*, 2039–2047. [[CrossRef](#)]
 86. Gomez, H.F.; Greenfield, D.M.; Miller, M.J.; Warren, J.S. Direct Correlation between Diffusion of *Loxosceles reclusa* venom and extent of dermal inflammation. *Acad. Emerg. Med.* **2001**, *8*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 87. Pauli, I.; Minozzo, J.C.; Henrique da Silva, P.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon* **2009**, *53*, 660–671. [[CrossRef](#)]
 88. Floriano, R.S.; Schezaro-Ramos, R.; Silva, N.J.; Bucarety, F.; Rowan, E.G.; Hyslop, S. Neurotoxicity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coral snake) venom in vertebrate neuromuscular preparations in vitro and neutralization by antivenom. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 2065–2086. [[CrossRef](#)]
 89. Barbaro, K.C.; Eickstedt, V.R.D.; Mota, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (araneae) species in Brazil. *Toxicon* **1994**, *32*, 113–120. [[CrossRef](#)]
 90. De Roodt, A.R.; Litwin, S.; Dokmetjian, J.C.; Vidal, J.C. A reduced immunization scheme to obtain an experimental anti-*Loxosceles laeta* (“Violinist spider”) venom. *J. Nat. Toxins* **2002**, *11*, 193–203.
 91. Guilherme, P.; Fernandes, I.; Barbaro, K.C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32–35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. *Toxicon* **2001**, *39*, 1333–1342. [[CrossRef](#)]

92. Feitosa, L.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Elias, M.C.Q.B.; Graner, E.; Mangili, O.C.; Brentani, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* **1998**, *36*, 1039–1051. [[CrossRef](#)]
93. Da Silveira, R.B.; Wille, A.C.M.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Silva, D.T.; Franco, C.R.C.; Toma, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* **2007**, *406*, 355–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Meissner, G.O.; Mangili, O.C.; Barbaro, K.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Senff-Ribeiro, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* **2010**, *92*, 21–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S.S. Loxosceles Astacin-Like Proteases (LALPs), an Astacin Metalloprotease Family from the Brown Spider Venom. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume Voume 1, pp. 1081–1086. ISBN 9780123822192.
96. Sade, Y.B.; Bóia-Ferreira, M.; Gremski, L.H.; Da Silveira, R.B.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 170–177. [[CrossRef](#)]
97. Buch, D.R.; Souza, F.N.; Meissner, G.O.; Morgon, A.M.; Gremski, L.H.; Ferrer, V.P.; Trevisan-Silva, D.; Matsubara, F.H.; Boia-Ferreira, M.; Sade, Y.B.; et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. *Toxicon* **2015**, *108*, 154–166. [[CrossRef](#)]
98. Barbaro, K.C.; Knysak, I.; Martins, R.; Hogan, C.; Winkel, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* **2005**, *45*, 489–499. [[CrossRef](#)]
99. Da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* **2007**, *49*, 758–768. [[CrossRef](#)]
100. Ferrer, V.P.; de Mari, T.L.; Gremski, L.H.; Trevisan Silva, D.; da Silveira, R.B.; Gremski, W.; Chaim, O.M.; Senff-Ribeiro, A.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)]
101. Coronado, M.A.; Ullah, A.; Silva, L.S.; Chaves-Moreira, D.; Vuitika, L.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S.; Chahine, J.; Murakami, M.T.; Arni, R.K. Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2015**, *16*, 768–774. [[CrossRef](#)]
102. Mariutti, R.B.; Chaves-Moreira, D.; Vuitika, L.; Caruso, Í.P.; Coronado, M.A.; Azevedo, V.A.; Murakami, M.T.; Veiga, S.S.; Arni, R.K. Bacterial and Arachnid Sphingomyelinases D: Comparison of Biophysical and Pathological Activities. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 2053–2063. [[CrossRef](#)]
103. Pace, L.B.; Vetter, R.S. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in small animals. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2009**, *19*, 329–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Felicori, L.; Fernandes, P.B.; Giusta, M.S.; Duarte, C.G.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chávez-Olórtegui, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine* **2009**, *27*, 4201–4208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. de Moura, J.; Felicori, L.; Moreau, V.; Guimarães, G.; Dias-Lopes, C.; Molina, L.; Alvarenga, L.M.; Fernandes, P.; Frézard, F.; Ribeiro, R.R.; et al. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine* **2011**, *29*, 7992–8001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Ramada, J.S.; Becker-Finco, A.; Minozzo, J.C.; Felicori, L.F.; Machado de Avila, R.A.; Molina, F.; Nguyen, C.; de Moura, J.; Chávez-Olórtegui, C.; Alvarenga, L.M. Synthetic peptides for invitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles antivenoms*. *Toxicon* **2013**, *73*, 47–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

107. Lima, S.D.A.; Guerra-Duarte, C.; Costal-Oliveira, F.; Mendes, T.M.; Luís, L.F.; Oliveira, D.; de Avila, R.A.M.; Ferrer, V.P.; Trevisan-Silva, D.; Veiga, S.S.; et al. Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 653. [[CrossRef](#)]
108. Bermúdez-Méndez, E.; Fuglsang-Madsen, A.; Føns, S.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Laustsen, A.H. Innovative immunization strategies for antivenom development. *Toxins* **2018**, *10*, 452. [[CrossRef](#)]
109. Van Meeteren, L.A.; Stortelers, C.; Moolenaar, W.H. Upregulation of cytokine expression in fibroblasts exposed to *Loxosceles* sphingomyelinase D: What is the trigger? *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 1266–1267. [[CrossRef](#)]
110. Anliker, B.; Chun, J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20555–20558. [[CrossRef](#)]
111. Chalfant, C.E.; Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: Expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4605–4612. [[CrossRef](#)]
112. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 139–150. [[CrossRef](#)]
113. Chaves-Moreira, D.; de Moraes, F.R.; Caruso, Í.P.; Chaim, O.M.; Senff-Ribeiro, A.; Ullah, A.; da Silva, L.S.; Chahine, J.; Arni, R.K.; Veiga, S.S. Potential Implications for Designing Drugs Against the Brown Spider Venom Phospholipase-D. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 726–738. [[CrossRef](#)]
114. Paixão-Cavalcante, D.; Van Den Berg, C.W.; Gonçalves-De-Andrade, R.M.; Fernandes-Pedrosa, M.D.F.; Okamoto, C.K.; Tambourgi, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 1410–1418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Okamoto, C.K.; van den Berg, C.W.; Masashi, M.; Gonçalves-de-Andrade, R.M.; Tambourgi, D.V. Tetracycline reduces kidney damage induced by *loxosceles* spider venom. *Toxins* **2017**, *9*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. de Medeiros, C.R.; Brioschi, M.L.; de Souza, S.N.; Teixeira, M.J. Infrared thermography to diagnose and manage venomous animal bites and stings. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2017**, *50*, 260–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Barrett, S.M.; Romine-Jenkins, M.; Blick, K.E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 2104–2107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Chávez-Olórtegui, C.; Zanetti, V.C.; Ferreira, A.P.; Minozzo, J.C.; Mangili, O.C.; Gubert, I.C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon* **1998**, *36*, 563–569. [[CrossRef](#)]
119. Miller, M.J.; Gomez, H.F.; Snider, R.J.; Stephens, E.L.; Czop, R.M.; Warren, J.S. Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: Application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. *Am. J. Emerg. Med.* **2000**, *18*, 626–628. [[CrossRef](#)]
120. Gomez, H.F.; Krywko, D.M.; Stoecker, W.V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. *Ann. Emerg. Med.* **2002**, *39*, 469–474. [[CrossRef](#)]
121. Krywko, D.M.; Gomez, H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Ann. Emerg. Med.* **2002**, *39*, 475–480. [[CrossRef](#)]
122. Stoecker, W.V.; Green, J.A.; Gomez, H.F. Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *55*, 888–890. [[CrossRef](#)]
123. Akdeniz, S.; Green, J.A.; Stoecker, W.V.; Gomez, H.F.; Keklikçi, S.U. Diagnosis of loxoscelism in two Turkish patients confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and non-invasive tissue sampling. *Dermatol. Online J.* **2007**, *13*, 11.
124. Stoecker, W.V.; Wasserman, G.S.; Calcara, D.A.; Green, J.A.; Larkin, K. Systemic loxoscelism confirmation by bite-site skin surface: ELISA. *Mo. Med.* **2009**, *106*, 425. [[PubMed](#)]
125. McGlasson, D.L.; Green, J.A.; Stoecker, W.V.; Babcock, J.L.; Calcara, D.A. Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clin. Lab. Sci.* **2009**, *22*, 216–222. [[PubMed](#)]
126. Dias-Lopes, C.; Paiva, A.L.; Guerra-Duarte, C.; Molina, F.; Felicori, L. Venomous arachnid diagnostic assays, lessons from past attempts. *Toxins* **2018**, *10*, 365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Arán-Sekul, T.; Rojas, J.M.; Subiabre, M.; Cruz, V.; Cortés, W.; Osorio, L.; González, J.; Araya, J.E.; Catalán, A. Heterophilic antibodies in sera from individuals without loxoscelism cross-react with phospholipase D from the venom of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2018**, *24*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

128. Jiacomini, I.; Silva, S.K.; Aubrey, N.; Muzard, J.; Chavez-Olortegui, C.; De Moura, J.; Billiald, P.; Alvarenga, L.M. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrototoxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. *Immunol. Lett.* **2016**, *173*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
129. Dos Santos, V.L.P.; Franco, C.R.C.; Viggiano, R.L.L.; Da Silveira, R.B.; Cantão, M.P.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). *Toxicon* **2000**, *38*, 265–285. [\[CrossRef\]](#)
130. Sapag, A.; Salinas-Luypaert, C.; Constenla-Muñoz, C. First report of in vitro selection of RNA aptamers targeted to recombinant *Loxosceles laeta* spider toxins. *Biol. Res.* **2014**, *47*, 2. [\[CrossRef\]](#)
131. Marsh, N.; Williams, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* **2005**, *45*, 1171–1181. [\[CrossRef\]](#)
132. Heine, R.J.; Van Gaal, L.F.; Johns, D.; Mihm, M.J.; Widel, M.H.; Brodows, R.G. Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **2005**, *143*, 559–569. [\[CrossRef\]](#)
133. Koh, D.C.I.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 3030–3041. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Mirshafiey, A. Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 353–361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Schmidtke, A.; Lötsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet* **2010**, *375*, 1569–1577. [\[CrossRef\]](#)
136. Chaim, O.M.; Trevisan-Silva, D.; Chaves-Moreira, D.; Wille, A.C.M.; Ferrer, V.P.; Matsubara, F.H.; Mangili, O.C.; da Silveira, R.B.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. *Toxins* **2011**, *3*, 309–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Norton, R.; Pennington, M.; Wulff, H. Potassium Channel Blockade by the Sea Anemone Toxin ShK for the Treatment of Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *11*, 3041–3052. [\[CrossRef\]](#)
138. Tambourgi, D.V.; De Sousa Da Silva, M.; Billington, S.J.; Gonçalves De Andrade, R.M.; Magnoli, F.C.; Songer, J.G.; Van Den Berg, C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* **2002**, *107*, 93–101. [\[CrossRef\]](#)
139. Murph, M.; Tanaka, T.; Liu, S.; Mills, G.B. Of spiders and crabs: The emergence of lysophospholipids and their metabolic pathways as targets for therapy in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6598–6602. [\[CrossRef\]](#)
140. Cho, J.H.; Han, J.S. Phospholipase D and its essential role in cancer. *Mol. Cells* **2017**, *40*, 805–813. [\[PubMed\]](#)
141. Houben, A.J.S.; Moolenaar, W.H. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2011**, *30*, 557–565. [\[CrossRef\]](#)
142. World Spider Catalog (2020). World Spider Catalog. Version 21.0. Natural History Museum Bern. Available online: <http://wsc.nmbe.ch> (accessed on 10 February 2020). [\[CrossRef\]](#)
143. Vetter, R.S. The distribution of brown recluse spiders in the southeastern quadrant of the United States in relation to loxoscelism diagnoses. *South. Med. J.* **2009**, *102*, 518–522. [\[CrossRef\]](#)
144. Cordeiro, F.A.; Amorim, F.G.; Anjolette, F.A.P.; Arantes, E.C. Arachnids of medical importance in Brazil: Main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2015**, *21*, 24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

